

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2000 年 12 月 7 日 (07.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/72670 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A01K 67/027, C12N 15/63, 5/10 (JP). イエネ ディーター イー (JENNE, Dieter E.) [DE/DE]; D-82061 ノイリード市 クラマーストリート 4 Neuried (DE).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/03504
- (22) 国際出願日: 2000 年 5 月 31 日 (31.05.2000) (74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (30) 優先権データ: 特願平11/153030 1999 年 5 月 31 日 (31.05.1999) JP (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 中外分子医学研究所 (CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.) [JP/JP]; 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地 2 Ibaraki (JP). 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 根津淳一 (NEZU, Jun-ichi) [JP/JP]. 大瀬飛鳥 (OSE, Asuka) [JP/JP]; 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 株式会社中外分子医学研究所内 Ibaraki (JP). 寺社下浩一 (JISHAGE, Kou-ichi) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: LKB1 GENE KNOCKOUT ANIMALS

(54) 発明の名称: LKB1遺伝子ノックアウト動物

(57) Abstract: Mammals capable of period-specifically and tissue-specifically disrupting LKB1 gene. These mammals are highly useful as a tool for clarifying the onset mechanism of diseases based on the defect of LKB1 gene (for example, Peutz-Jeghers syndrome and cancer) and developing remedies, treatment methods, etc. therefor.

(57) 要約:

LKB1 遺伝子を時期特異的、組織特異的に破壊しうる哺乳動物が提供された。本発明の哺乳動物は、ポイツ・イエーガー症候群や、その他癌などの LKB1 遺伝子の欠損に基づく疾病の発症機構の解明、及び治療薬、治療法等の開発の為のツールとして非常に有用である。

WO 00/72670 A1

明細書

LKB1 遺伝子ノックアウト動物

技術分野

本発明は、LKB1 遺伝子の機能が欠損した哺乳動物、およびその作製方法に関する。ヒト LKB1 遺伝子はポイツ・イエーガー症候群の原因遺伝子であり、該哺乳動物は該疾患の治療法や治療薬開発のために利用されうる。

背景技術

ポイツ・イエーガー症候群(Peutz-Jeghers Syndrome, MIM 175200, PJS)は、消化管におけるポリポシス症と、粘膜や皮膚における色素班形成を主な症候とするヒトの遺伝病である。PJS は常染色体優性遺伝形式により遺伝するが、1997 年 Hemminki 等により、PJS 患者家系における連鎖（リンケージ）解析からその原因遺伝子は第 19 番染色体 p13.3 領域にマップされることが示された (Hemminki A et al, Nat Genet 1997 Jan;15(1):87-90)。この領域には本発明者らが見いだしていた新規セリン／スレオニンキナーゼ LKB1 が存在することから、Jenne 等はこれを原因遺伝子の候補であると考え、PJS 患者における LKB1(STK11)遺伝子の変異解析を行ったところ、調べた全ての患者において LKB1 遺伝子の変異が存在することが明らかとなった (PCT/JP98-05357; Jenne DE et al, Nat Genet 1998 Jan;18(1):38-43)。さらに、他のグループからも同様の報告が相次いでなされ、現在までに少なくとも 60 種類以上の LKB1 遺伝子変異が PJS 患者において見いだされている (Hemminki A et al, Nature 1998 Jan 8;391(6663):184-7; Nakagawa H et al, Hum Genet 1998 Aug;103(2):168-72; Resta N et al, Cancer Res 1998 Nov 1;58(21):4799-801; Ylikorkala A et al, Hum Mol Genet 1999 Jan;8(1):45-51)。さらに本発明者らは、LKB1 遺伝子産物が自己リン酸化能を持つキナーゼで

あり、PJS 患者において見いだされたミスセンス変異はキナーゼ活性を失う変異であることの証明を行った(Mehenni H et al, Am J Hum Genet 1998 Dec;63(6):1641-50)。これらのことより、LKB1 セリン／スレオニンキナーゼの遺伝子変異による機能欠損が PJS の発症原因であることが確証されるに至っている。

また、PJS 患者は様々な癌に対する発症リスクが健常人に比較し著しく増加していることが疫学的研究から知られており、このことからその原因遺伝子は癌抑制遺伝子様の活性を持つことが推測されていた。実際、PJS と無関係な散发性の癌においても LKB1 遺伝子の変異がみられることが報告されてきており、一般の散发性癌においても LKB1 遺伝子の不活が関与していることが明らかとなりつつある (Dong SM et al, Cancer Res 1998 Sep 1;58(17):3787-90; Rowan A et al, J Invest Dermatol 1999 Apr;112(4):509-11; Guldberg P et al, Oncogene 1999 Mar 4;18(9):1777-80)。しかし、正常細胞における LKB1 の具体的な生理機能や、その不活化がポリポーシス症や癌化などを引き起こすメカニズムについては未だ全く不明のままである。

発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、LKB1 の機能解析や LKB1 の変異に起因する疾患ための薬剤の開発に有用な非ヒト哺乳動物を提供することを課題とする。より詳しくは、LKB1 遺伝子の発現が人為的に抑制されたノックアウト動物およびその作製方法を提供することを課題とする。本発明の好ましい態様においては、内在性 LKB1 遺伝子を誘導的に欠損させることができる非ヒト哺乳動物を提供する。

本発明者らは、人為的に LKB1 遺伝子を欠損させた、または欠損を誘導することが可能な哺乳動物モデルの作製を試みた。具体的には、実施例に詳しく示されるように、マウス LKB1 遺伝子 (ゲノム DNA、cDNA) のクローニングを行い、これを用いて相同組み換え用のベクターを構築し、これをマウス胚性幹細胞 (ES 細胞)

に導入して組み換えクローンを得て、それをマウス個体に戻すという手法により変異した LKB1 遺伝子を持つマウスを得ることに成功した。本発明者等は、該マウスの作成において、Cre-loxP システム（後述）を利用することにより、時期特異的、また組織特異的に LKB1 遺伝子変異を誘発することを可能にした。これにより、従来問題であった目的遺伝子の不活化が胎児性致死を引き起こす可能性を回避した。本発明により得られた哺乳動物（あるいはそれから樹立した細胞株）は、PJS や癌などの LKB1 遺伝子の欠損に基づく各種疾患の発症メカニズムを解明するためのツールとして、さらにはこれらの疾患に対する治療法や治療薬の開発に対しても非常に有用なツールであると考えられ、様々な目的に応用されることが期待される。

本発明は、LKB1 遺伝子の発現を人為的に抑制しうる、または抑制された非ヒト哺乳動物およびその作製方法に関し、より具体的には、

- (1) 内在性 LKB1 遺伝子の発現を人為的に抑制することができる非ヒト哺乳動物、
- (2) 内在性 LKB1 遺伝子の発現の抑制を、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部を欠損させることにより誘導する、(1)に記載の非ヒト哺乳動物、
- (3) ゲノム上の LKB1 遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部が、少なくとも 1 組の loxP 配列により挟まれた構造を有する、(1) または (2) に記載の非ヒト哺乳動物、
- (4) げっ歯類である、(1) から (3) のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物、
- (5) マウスである、(4) に記載の非ヒト哺乳動物、
- (6) LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されている非ヒト哺乳動物、
- (7) LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現が、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部の欠損により抑制されている、(6)に記載の非ヒト哺乳動物、

(8) げっ歯類である、(6) または (7) に記載の非ヒト哺乳動物、

(9) マウスである、(8) に記載の非ヒト哺乳動物、

(1 0) LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現の抑制を人為的に誘導することができ、かつ、個体へ分化させることが可能な非ヒト哺乳動物細胞、

(1 1) LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現の抑制を、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部を欠損させることにより誘導する、(1 0) に記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(1 2) ゲノム上の LKB1 遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部が、少なくとも 1 組の loxP 配列により挟まれた構造を有する、(1 0) または (1 1) に記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(1 3) Cre 遺伝子を発現可能に保持している、(1 2) に記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(1 4) げっ歯類細胞である、(1 0) から (1 3) のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(1 5) マウス細胞である、(1 4) に記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(1 6) 胚性幹細胞である、(1 0) から (1 5) のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(1 7) LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されており、かつ、個体へ分化させることが可能な非ヒト哺乳動物細胞、

(1 8) LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現が、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部の欠損により抑制されている、(1 7) に記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(1 9) (1 2) に記載の非ヒト哺乳動物細胞において Cre 遺伝子を発現させることによって得られる、(1 8) に記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(2 0) げっ歯類細胞である、(1 7) から (1 9) のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(21) マウス細胞である、(20)に記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(22) 胚性幹細胞である、(17)から(21)のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(23) (1)から(5)のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

(a) (16)に記載の非ヒト哺乳動物細胞を、妊娠した雌から得た胚に挿入する工程、および

(b) 該胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法、

(24) (6)から(9)のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

(a) (22)に記載の非ヒト哺乳動物細胞を、妊娠した雌から得た胚に挿入する工程、および

(b) 該胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法、

(25) (7)に記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

(a) (3)に記載の非ヒト哺乳動物の受精卵または胚を提供する工程、

(b) 該受精卵または胚に Cre 遺伝子を導入し、発現させる工程、および

(c) 該受精卵または胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法、

(26) (7)に記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、(3)に記載の非ヒト哺乳動物に、Cre 遺伝子を導入し、発現させる工程、を含む方法、

(27) (7)に記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、(3)に記載の非ヒト哺乳動物を、Cre 遺伝子をゲノム上に有する非ヒト哺乳動物と交配させ、その後代を得る工程を含む方法、に関する。

なお、本発明において「遺伝子の発現の抑制」には、完全な抑制および部分的な抑制が含まれる。また、特定の環境下での抑制も含まれる。また、2つのアレルの一方の発現が抑制されている場合も含まれる。

相同組み換え（ノックアウト）用ベクターの構築

LKB1 の遺伝子の発現が人為的に抑制されたノックアウト動物を作製するためには、まず、LKB1 遺伝子をクローニングし、これを基に標的動物における内在性 LKB1 遺伝子を失活させるための相同組換え用ベクターを構築する。

該相同組換え用ベクターは、標的動物の内在性 LKB1 遺伝子を失活させるために設計された核酸配列を含む。このような核酸配列は、例えば、LKB1 遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部を欠失させた核酸配列でもよく、また、LKB1 遺伝子またはその発現制御領域に他の遺伝子が挿入された核酸配列であってもよい。このように LKB1 遺伝子またはその発現制御領域に挿入される他の遺伝子としては、マーカーとしても機能する遺伝子が好ましい。このような遺伝子としては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子 (G418 耐性により選択) やチミジinkinナーゼ遺伝子 (ガンミクロビル耐性により選択) などの薬剤耐性遺伝子、ジフテリア毒素 (DTA) 遺伝子などの毒素遺伝子、またはこれらの組み合わせを用いることができる。これら遺伝子の LKB1 遺伝子における挿入場所は、標的における内在性 LKB1 遺伝子の発現を抑制しうる位置であれば特に限定されない。

また、該核酸配列は、LKB1 遺伝子のイントロンにファージ DNA 由来の loxP (locus of X-ing-over) 配列を 2 カ所以上挿入されたものであってもよい。

loxP 配列は、部位特異的組み換え酵素の一つである Cre (Causes recombination) リコンビナーゼの認識配列である (Sternberg, N and Hamilton, D. J. Mol. Biol. 150, 467-486, 1981)。Cre リコンビナーゼは、2 つの loxP 配列を認識し、これらの間で部位特異的組み換えを起こすことによりその間の遺伝子を排除する (以下 Cre-loxP システム)。このシステムを用いた応用例を図 5 に示した。3 つの loxP 配列を有する相同組み換え用ベクターを構築し、それを、例えば、胚性肝細胞 (ES 細胞) に導入して相同組み換え体を得られたならば、この ES 細胞内に Cre を一過性に発現させることにより、コンベンショナルな遺伝子欠失を持つタイプ (タイプ 1) と、コンディショナルな遺伝子欠失を持つタイプ (タイプ 2) の両タイプの ES 細胞をさらに作製することが可能である。即ち、3 つの loxP 配列を

有するコンストラクトを用いると、1つの相同組み換え体から Cre を発現させることだけで2つの遺伝子型を持つES細胞クローンを作製できるという利点がある。タイプ2のES細胞由来の個体は野生型の表現型を示すが、Cre 遺伝子を発現させることによりタイプ1に転換できる。

この Cre-loxP システム同様に、FRT (Flp recombinase target) 配列と、それを認識して部位特異的組み換えを起こす酵母由来の Flp リコンビナーゼとの組み合わせを用いてもよい。

クローニングした LKB1 遺伝子へのこれらの遺伝子の挿入は、試験管内において、通常の DNA 組み換え技法を用いて行うことができる (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))。

細胞のトランスフェクション

このようにして構築された相同組み換え用ベクターを、個体へ分化させることが可能な非ヒト哺乳動物細胞（例えば、ES 細胞）に導入し、該細胞中の LKB1 遺伝子との相同組み換えを行う。本発明において用いられる非ヒト哺乳動物細胞としては、その由来する生物に特に制限はないが、好ましくはげっ歯類、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギなどである。

相同組み換え用ベクターの細胞への導入は、当業者によく知られた方法、例えば、エレクトロポレーション法を利用して行うことができる。この結果、一部の細胞内においては細胞中の LKB1 遺伝子と相同組み換え用ベクターの対応する領域との間で組み換えが生じ、相同組み換え用ベクター中に構築されていた遺伝子型と野生型の遺伝子とが置き換わることとなる。このようにしてマーカー遺伝子や loxP 配列が挿入された LKB1 遺伝子を持つ細胞を得ることができる。

相同組換えベクターにおいてマーカー遺伝子を利用している場合には、所望の相同組換えが行われた細胞は、LKB1 遺伝子が失活し、同時にマーカー遺伝子を得ることとなるので、このマーカー遺伝子を指標とすることにより選抜を行なうことができる。例えば、マーカー遺伝子として、薬剤耐性遺伝子を用いた場合に

は、ベクター導入後の細胞を、致死濃度の薬剤の存在下で培養することにより、所望の相同組換えが行なわれた細胞を選抜することができる。

ただし、Cre-loxP システムを用いた場合は、loxP 配列とマーカー遺伝子はイントロン中に挿入されるように相同組み換え用ベクターは設計されることがあるため、その場合には、細胞内において LKB1 遺伝子が失活しているとは限らない。この場合、LKB1 遺伝子の失活は、Cre リコンビナーゼを該細胞中で発現させ、loxP 配列に挟まれた領域を排除することにより成し遂げられる。

細胞における Cre リコンビナーゼの発現は、例えば、アデノウイルスなどの発現ベクターを利用する方法や、組織特異的、あるいは時期特異的に発現を制御できるプロモーターで Cre の発現を制御したトランスジェニック動物と Cre-loxP システムを保有する動物とを交配することにより行うことができる。Cre の発現を制御したトランスジェニック動物と Cre-loxP システムを保有する動物との交配では、一回目の交配では、LKB1 遺伝子の一方のみが欠失する（ヘテロである）ノックアウト動物が得られるが、交配を繰り返すことにより、LKB1 遺伝子がすべて欠失するノックアウト動物を得ることができる。

胚への注入および胚の移植

本発明において ES 細胞を用いた場合には、これを胚盤胞に注入することによりキメラ胚を作製し、さらに偽妊娠させた哺乳動物の子宮角に移植して産仔を得る。注入に用いる胚盤胞は妊娠した雌の子宮を灌流することによって得ることができる。ES 細胞が発生分化中の胚に取り込まれたか否かを個体作製後に検定できるようにするために、作製された個体の外部的特徴（例えば、毛色）が ES 細胞に由来する部分と胚盤胞に由来する部分とで異なるように、胚盤胞を選択することが好ましい。

次に、こうして得たキメラ動物を適当な系統の同種動物と交配させることにより産仔を得る。キメラ動物の生殖細胞が相同性組み換え体 ES 細胞に由来すれば LKB1 遺伝子が破壊された産仔を得ることができる。ただし、Cre-loxP システムを

用いた場合は、loxP 配列とマーカー遺伝子はイントロン中に挿入されるように相同組み換え用ベクターは設計されていることもあるので、その場合 LKB1 遺伝子が失活しているとは限らない。この場合、Cre リコンビナーゼを体細胞、あるいは受精卵などの生殖細胞に発現させることによって LKB1 遺伝子を失活させることができる。

本発明において ES 細胞を用いず、他の体細胞を用いる場合は、体細胞クローン動物の作製技術に従ってノックアウト動物の作製を行うことができる。具体的には、例えば

- 1) 繊維芽細胞等の ES 細胞以外の細胞を用いて、ES 細胞の場合と同様な方法によって相同組換え法により遺伝子に変異が導入された細胞を樹立する。
- 2) この細胞より、体細胞クローン動物作製の技術を応用し、変異遺伝子を持つ動物を作成する (Wilmot I. et al., 1997, ; Nature 385: 810-803; Wakayama, T. et al., 1998, Nature 394: 369-374)。
- 3) こうして生まれた変異遺伝子を持つ動物は、ES 細胞を用いた場合の F1 マウスに相当し、それ以降は ES 細胞を用いた場合と同様に使用することができる。

ノックアウト動物の用途

本発明のノックアウト動物は、LKB1 遺伝子の機能不全に起因する種々の疾患に対する治療薬や治療方法の開発に有用である。例えば、本発明のノックアウト動物に被検化合物を投与し、ポリープ形成、癌発生、色素斑形成に対する影響を検査し、所望の効果を示す化合物を選択する。

また、ノックアウト動物から調製された細胞を用いた治療薬や治療方法の開発も考えられる。例えば、本発明のノックアウト動物の胚などから細胞を調製し、被検化合物を添加し、細胞の増殖、寒天中などにおけるコロニー形成能、フォーカス形成能、移動能などに対する影響を調べる。その結果、所望の効果を示す化合物を選択する。細胞は、初代培養細胞を用いることもできれば、株化した細胞を作製して用いることもできる。以上によりスクリーニングされた化合物は医薬

品の候補となる。

図面の簡単な説明

図 1 は、上部は、マウス LKB1 遺伝子のエキソン／イントロン構造を表す。各エキソンをボックスで示した。特にタンパクをコードする部分は斜め線のボックスで表した。下は、2つのコスミドクロンによりカバーされる領域を表す。

図 2 は、マウス LKB1 遺伝子のエキソン 2 からエキソン 10 までの塩基配列を、エキソン部分を大文字で、イントロン部分を小文字で表した図である。

図 3 は、図 2 の続きである。

図 4 は、図 3 の続きである。

図 5 は、Cre-loxP システムの応用例。黒い三角が loxP 配列を表す。Cre リコンビナーゼの発現により部位特異的相同組み換えが起こり、二つのタイプの遺伝子型（タイプ 1、タイプ 2）が得られる。

図 6 は、F23 合成リンカーおよび loxP2 合成リンカーの構造を示す図である。

図 7 は、相同組み換え用ベクターの模式図と、このベクターの導入により構築される遺伝子型の模式図。×印で示した領域において相同組み換えが起こり、組み換えアリルが生じる。これに Cre リコンビナーゼを発現させることにより、コンディショナルターゲティングと、コンベンショナルターゲティングの 2 種類の遺伝子型が生じる。

図 8 は、各 ES 細胞クローンの遺伝子型検査の写真である。PCR 解析（左）及びサザンブロット解析（右）のいずれにおいても組み換え変異アリルが存在することが確かめられた。

図 9 は、キメラマウスの交配によって得られた F1 マウスのサザンブロットによる遺伝子型検査の写真である。右のパネルに示したマウスにおいては、正常アリルと共に変異アリルを示すバンドがみられ、ES 細胞の変異アリルが F1 マウスに伝達されていることが確かめられた。数字は、それぞれのマウスが由来する ES

細胞クローンを表す。

図10は、組み換えアリル、コンディショナルアリル、及びヌルアリルの模式図である。各プライマー及び各プローブの相対的な位置を表す。

図11

A ヌルアリルを検出するプライマーセット (A セット) による PCR の結果を示す写真である。N はヌルアリル由来のバンド (約 2.1kbp) がみられるサンプル。O はそれ以外のアリルを持つサンプル。

B ヌルアリルを検出するプライマーセット (B セット) による PCR の結果を示す写真である。N はヌルアリル由来のバンド (約 1.2kbp) がみられるサンプル。O はそれ以外のアリルを持つサンプル。

C プローブ7を用いたサザンブロット法による解析の結果を示す写真である。N はヌルアリル由来のバンドがみられるサンプル。W は野生型アリル由来のバンドのみが見られるサンプル。全てのサンプルに野生型アリル由来のバンドが見られる。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1] LKB1 遺伝子の相同組み換え用ベクターの作製

本実施例では、マウス LKB1 遺伝子の相同組み換え用ベクターを構築するために、まずマウス LKB1 ゲノム遺伝子のクローニングを行った。このゲノム DNA を用い、Yagi らの報告 (Yagi, T et al. Analytical Biochemistry 214:77-86, 1993) に従ってポジティブ/ネガティブセレクションを行うために、ネオマイシン耐性遺伝子およびジフテリア毒素 A 遺伝子を挿入した相同組み換え用ベクターを構築した。この際、ネオマイシン耐性遺伝子の両端及びイントロン8の計3カ所に同じ向きになるように loxP 配列を挿入し、Cre リコンビナーゼによる部位特異的相同組み

換えが可能となるようにした。以下具体的に説明する。

A. マウス LKB1 遺伝子のクローニング

ヒト LKB1 cDNA の配列を用いデータベースをサーチすることにより、これと非常に高い相同性を示すマウス由来の EST(Expressed Sequence Tag)をいくつか見いだした。これらの配列から MPJ 85 プライマー(5' GATGAATTCCGAAGGACAGAGGA CAAAGAGTGG 3' : 配列番号 : 4)及び LK E2 プライマー(5' GATGAATTCTTAGAGGTCTT CTCTGAGATGAGCTTCTGCTCCTGCTGCTTGCAGGCCGA 3' : 配列番号 : 5)を作製し、マウス 17 日目胚由来 Marathon Ready™ cDNA (CLONTECH)を鋳型とした PCR を行い、マウス LKB1 の全オープンリーディングフレーム(ORF)を含む cDNA を増幅した。これをプライマーの両端に付加した EcoRI で切断し、pcDNA3 ベクター(Invitrogen)にサブクローニングした。複数のクローンをシーケンシングすることにより遺伝子の配列の決定を行った。また、マウス LKB1 cDNA の 5' 側は 5' RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends 法)によりクローニングした。すなわち、マウス 17 日目胚由来 Marathon Ready™ cDNA(CLONTECH)を鋳型とし、MPJ15 プライマー(5' TGC GCAGCTTTTCTCTTGAGGA 3' : 配列番号 : 6)とキットに添付されたアダプタープライマー(API プライマー)を用いた PCR を行い、増幅された約 400bp の断片を TA クローニング法にて pT7Blue-T ベクター (Novagen) にサブクローニングした。得られたサブクローンを複数シーケンシングすることによりマウス LKB1 cDNA の 5' 側の配列を決定した。こうして得られたマウス LKB1 cDNA の配列を配列番号 : 1 に、またそのアミノ酸配列を配列番号 : 2 に示す。

マウス LKB1 ゲノム DNA は以下のようにしてクローニングした。

ドイツヒトゲノムプロジェクトリソースセンター(RZPD)より、マウス(129/Ola ストレイン)ゲノム DNA ライブラリーをグリッドしたフィルターを購入した。このライブラリーは以下のような特徴を有する。

ゲノム DNA : 129/Ola マウスの脾臓細胞より調製した DNA。Mbo I によるパーシャル切断。

ベクター：コスミドベクターlawrist 7。

ヒト LKB1 cDNA をプローブとし、通常の条件でこのフィルターに対してハイブリダイゼーションと洗浄を行った。その結果、2つのクローン、P2436Q3 (クローン 243) 及び L07209Q3 (クローン 072) において陽性シグナルが認められた。これらのクローンを RZPD から購入し、さらに PCR によってマウス LKB1 遺伝子を含んでいることを確認した。すなわち、これらのコスミドクローンを保持する大腸菌を 30 μ g/ml のカナマイシンを含む LB 培地で培養し、QIAGEN maxi キット(Qiagen)を用いたアルカリ SDS 法によりコスミド DNA を調製した。コスミド DNA を鋳型とし、DJ666 プライマー(5' GGTGATGGAGTACTGCGTGTG 3' : 配列番号 : 7)及び MPJ18 プライマー(5' GGTGAAGTCTCCTCTCCCAATGTT 3' : 配列番号 : 8)を用いた PCR を行い、マウス LKB1 遺伝子の断片が増幅されることを確認した。

これらのコスミド DNA から、マウス LKB1 cDNA の配列などをもとに作製したプライマーを用いた PCR によりマウス LKB1 遺伝子をいくつかの断片に分けて増幅し、それらを直接シーケンシングすることにより塩基配列を決定した。得られたゲノム DNA 配列を cDNA の配列と比較することにより、エキソン/イントロン構造を決定した。その結果、両クローンともイントロン 1 の途中からエキソン 10 までを含んでおり、クローン 072 の方が数 kbp 長いイントロン 1 を含んでいることが明らかとなった (図 1)。次に、イントロン 1 内に作製した MPJ67 プライマー(5' ACTGCAGCTGACCCAAGCCAGGAT 3' : 配列番号 : 9)とマウス LKB1 cDNA の 5' 非翻訳領域(UTR)中に作製した MPJ13 プライマー(5' CGAAGGACAGAGGACAAAGAGTGG 3' : 配列番号 : 10)を用い、マウスゲノム DNA を鋳型とした PCR を行い、残りのイントロン 1 と、エキソン 1 を含む断片をクローニングした。以上の様にして、マウス LKB1 ゲノム DNA のエキソン 1 からエキソン 10 のクローニングを行った。マウス LKB1 遺伝子のエキソン/イントロン構造を図 1 に模式的に示す。また、エキソン 2 からエキソン 10 までの塩基配列を配列番号 : 3 に示す。この塩基配列を、エキソン部分を大文字で、イントロン部分を小文字で表したものを、図 2、3、4 に示

す。

B. 相同組み換え用ベクターの構築

クローン 072 コスミド DNA に含まれるマウス LKB1 遺伝子を、HindIII サイトによって分割される 4 つの断片（断片 1～4、図 1）に分けてそれぞれプラスミドベクターにサブクローニングを行った。すなわち、まずクローン 072 コスミド DNA を SfiI で切断し、この切断末端を TaKaRa DNA blunting kit(TaKaRa)を用いた方法により平滑末端化した。これをさらに HindIII で切断し、生じた約 8kbp の断片（断片 1）を pBluescript II ベクター(TOYOBO)の SmaI/HindIII サイトに組み込み、クローン MGF-10 を得た。また、クローン 072 コスミド DNA を HindIII によって切断し、生じた約 1kbp の 2 つの断片（断片 3、断片 4）、及び約 4kbp の断片（断片 2）をそれぞれ pUC18 ベクター(Pharmacia)の HindIII サイトに組み込み、クローン MGG-1（断片 2）、クローン MGD-2（断片 3）、及びクローン MGD-3（断片 4）を得た。

これらのサブクローンから以下のようにして相同組み換え用のベクターを構築した。まず、クローン MGF-10 から NotI/XhoI によって切り出される断片 1 を、ジフテリア毒素 A 遺伝子、及び mRNA 不安定化配列(A+T)を持つプラスミド(DT-A カセット B、Yagi, T et al. Analytical Biochemistry 214:77-86, 1993)の NotI/XhoI サイトに挿入し、クローン LT1 を得た。クローン MGG-1 の AvaIII とベクター中の EcoRI サイトの間に F23 合成リンカー（図 6）（上段：配列番号：11、下段：配列番号：12）を挿入し、クローン LT2 を得た。LT2 から HindIII/ClaI で切り出される断片（断片 2）をクローン LT1 の HindIII/ClaI サイトに挿入し、LT4 を得た。pBluescript II ベクターの SpeI/XhoI サイトに loxP2 合成リンカー（図 6）（上段：配列番号：13、下段：配列番号：14）を挿入したクローン loxP2 を作製し、この EcoRI/BamHI サイトに polyA 添加シグナルを持たないネオマイシン耐性遺伝子を組み込み、両側を 2 つの loxP 配列に挟まれたネオマイシン耐性遺伝子のカセット、クローン loxP2/neo-を得た。このクローンから HindIII により

ネオマイシン耐性遺伝子を切り出し、LT4の断片1と断片2の間（イントロン1）のHindIIIサイトに挿入し、クローンLT-5を得た。クローンMGD-2を鋳型とし、LOXP3 A1プライマー（5' GATGTTCCACCTCGAGCCCAGGCTCCAGAGGTCACT 3' : 配列番号 : 15）及びLOXP3 S3プライマー（5' GATCTCGAGATCGATGGTACCGGTGTTCCACATACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCTGTCCACTGTGTCTGCAGGT 3' : 配列番号 : 16）を用いたPCRにより、断片3の5'側にloxP配列とXhoI/ClaI/KpnI/Cfr10Iサイトを付加した断片を増幅し、これをpBluescript IIベクターのXhoIサイトに挿入し、クローンLT3を得た。最後に、クローンLT3より5'側にloxP配列を持つ断片3をClaI/XhoIによって切り出し、クローンLT5中の断片2の3'側のClaI/XhoIサイトに挿入することにより相同組み換え用ベクターLT6を得た。

このベクターは以下のような特徴を持つ（図7）。

- (i) 第1イントロンに、loxP配列を両端に持つネオマイシン耐性遺伝子が、そして第8イントロン中にはもう一つのloxP配列が挿入されている。
- (ii) 第8イントロン中に挿入されたloxP配列にはKpnIサイトが付加されており、このベクター由来の変異アリルをサザンロットで見分けることができる。
- (iii) ネガティブ選択用マーカー遺伝子としてジフテリア毒素A遺伝子を持つ。
- (iv) 野生型LKB1遺伝子との相同部分は、ネオマイシン耐性遺伝子上流が約7 kb、ネオマイシン耐性遺伝子から第8イントロンのloxP配列までが約4 kb、そして第8イントロンのloxP配列から下流が約0.9 kbである。

【実施例2】 相同組み換えによる変異LKB1遺伝子を持つES細胞の樹立

本実施例では、相同組み換え用ベクターを、エレクトロポレーション法によりマウスES細胞AB2.2-Prime ES Cells (LEXICON社 The Mouse Kit)に導入し、次いでG418により選択培養を行った。得られたG418耐性コロニーについて、PCRおよびサザンロットにより相同組み換え体の検定を行った。以下、具体的に説明する。

相同組み換え用ベクター (LT6) DNA 60 μ g をNotIで切断することにより線状

化し、精製した。この DNA をマウス ES 細胞 AB2.2-Prime ES Cells (LEXICON 社 The Mouse Kit) 3×10^7 個を含むエレクトロポレーション用緩衝液 (LEXICON 社 The Mouse Kit ESQPBS) に懸濁し、Field Strength 575V/cm、Capacitance $500 \mu\text{F}$ の条件で、遺伝子導入を行った。導入後 24 時間から終濃度 $300 \mu\text{g/ml}$ の G418 (Genetisin, Sigma) で選択培養を行った。

ES 細胞の培養には、ダルベッコ修正イーグル培養液 (GIBCO DMEM 11965-092) に終濃度 15% の牛胎児血清 (FBS)、終濃度 2mM の L-グルタミン (GIBCO 25030-081)、終濃度 50U/ml のペニシリンと終濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシンを添加した ES 細胞用培地を用いた。

また、ES 細胞用のフィーダー細胞としては ESQ Feeder cells (LEXICON 社 The Mouse Kit) を用い、培養液は ESQ DMEM に終濃度 7% の FBS を添加したものを用いた。ESQ Feeder cells (5×10^7 細胞/バイアル) を、 37°C で急速融解後、フィーダー用培地で細胞数 4.4×10^5 cells/ml に調整し、あらかじめゼラチンコート (LEXICON 社 The Mouse Kit ESQ Gelatin) した培養器に、 100mm ϕ ディッシュの場合は 12ml 、 60mm ϕ ディッシュの場合は 4ml 、6 穴プレートの場合は 2ml /穴、24 穴プレートの場合は 0.5ml /穴、そして 96 穴プレートの場合は $75 \mu\text{l}$ /穴ずつ分注した。以上のように作製したフィーダー細胞は 3 週間以内に使用した。

遺伝子導入後 11 日目から、以下のようにして、出現した G418 耐性コロニーを 96 穴のマイクロプレートに継代した。すなわち、マイクロピペットを用いて G418 耐性コロニーを $30 \mu\text{l}$ の TE (Gibco Trypsin-EDTA 25200-072) 溶液を含む 96 穴のマイクロプレート (Corning 25860MP) に移し換え、数分間処理した後、 $70 \mu\text{l}$ の ES 細胞培養用培地を加え、ピペティングすることによって単一細胞にした。この細胞懸濁液を 96 穴のマイクロプレート (Falcon 3072) に移し換え培養を継続した。3 日後、96 穴のマイクロプレート上の細胞がコンフルエントに達した段階で、以下のようにして細胞を 2 つに分割した。すなわち、細胞に TE を $25 \mu\text{l}$ 加え分散させ、ES 細胞用培地を $25 \mu\text{l}$ 加えピペティングすることによって単一細

胞にした後、2×Freezing medium (LEXICON 社 The Mouse Kit ESQ DMEM:ESQ FBS: DMSO=2:2:1) を 50 μ l 加え、その 20 μ l を ES 細胞用培地 150 μ l の入ったゼラチンコートした 96 穴マイクロプレート (Iwaki 4860-020) に継代し、PCR による相同組み換え体検定用の DNA を抽出するために培養した。残りの ES 細胞には、流動パラフィン 100 μ l、(0.2 μ m のフィルターで濾過滅菌したもの) を加え、-80°C で凍結保存した。尚、DNA 抽出用の ES 細胞の培養にはフィーダー細胞は用いず、その他の ES 細胞の培養には全てフィーダー細胞を用いて行った。相同組み換え体の検定は、PCR によって以下の通りに行った。すなわち、コンフルエントの状態まで細胞が増殖した 96 穴プレートの各ウェルから培地を取り除き、Lysis buffer (10x Taq buffer 5 μ l、5% NP-40 5 μ l、Proteinase K 4 μ l、H₂O 36 μ l) を加え、55°C で 2 時間加温した。溶解したサンプルを 0.5ml チューブに回収し、95°C で 15 分間処理した後 10,000rpm で 10~15 分間遠心し、その上清 1 μ l を PCR 用の鋳型 DNA として用いた。

PCR のプライマーは、相同組み換え用ベクター上の 3' 側の loxP と、相同組み換え用ベクターに含まれないエキソン 10 との間、約 2.1kb が増幅されるように設計した。

すなわち、第 8 イントロンに挿入した loxP 配列を含む LOXP3 S2 プライマー (5' CCGGTGTTCCACATAACTTC 3' : 配列番号 : 17) 及び第 10 エキソンに位置する MP J37 プライマー (5' GTTCCCAAGCTTTATTATTGCC 3' : 配列番号 : 18) を用いて、以下の条件で PCR を行った。

反応液組成

10 x ExTaq バッファー (TaKaRa) 5 μ l

2.5mM dNTPs 4 μ l

ExTaq (TaKaRa) 0.5 μ l

20 μ M LOXP3 S2 プライマー 1 μ l

20 μ M MPJ37 プライマー 1 μ l

サンプル 1 μ l

H₂O 37.5 μ l

反応条件

94°C、2 分→ (94°C、30 秒→68°C、4 分) x 36 サイクル→72°C、10 分

PCR の結果から相同組み換え体であると考えられたクローンについては、さらにサザンプロットによる確認を行った。すなわち、ES 細胞から調製したゲノム DNA を制限酵素 KpnI で消化し、0.8%アガロース電気泳動後 Hybond N+ポジティブチャージナイロンフィルター(Amersham)に転写し、第 9、10 エクソンを含む約 700bp の断片 (プローブ 1) をプローブとし、ハイブリダイゼーションを行った。プローブ 1 は、クローン 072 コスミド DNA を鋳型とし、MPJ22 プライマー (5' CAGCAGCAAGGTGAAGCCAGAAGG 3' : 配列番号 : 19) 及び MPJ37 プライマー (配列番号 : 18) (前出) を用いて PCR によって増幅して得た。ハイブリダイゼーションは ExpressHyb™ Hybridization solution(CLONTECH)を用い、メーカー推奨の方法に従って行った。相同組み換えを起こしたアリルは、loxP 配列に人工的に付加された KpnI サイトのため、野生型アリル由来のバンドよりも約 2.6kb 短いバンドとして検出され、このバンドの有無により相同組み換え体かどうかを判断した。相同組み換え体クローンは、調べた 6418 耐性クローン 562 個中 4 個 (クローン 236、クローン 256、クローン 260、クローン 358) であった。

尚、PCR の検査成績とサザンプロット解析による成績は完全に一致した (図 8)。

PCR 及びサザンプロット解析で相同組み換えが確認されたクローンは、凍結保存してあった 96 穴プレートを 37°C に温めることにより融解し、24 穴プレートに継代した。この 24 穴プレートを 24 時間、37°C で培養後、DMSO と流動パラフィンを除くために培地を交換した。それぞれのクローンが 75~90%コンフルエントに

達した時点で 24 穴から 6 穴プレートに継代した。さらに、6 穴プレートに 75~90%コンフルエントまで増殖したものが 2 穴分得られたところで、1 穴分は凍結保存し、残りの 1 穴分は胚盤胞への注入及び DNA 抽出に使用した。

凍結保存は以下の如く行った。すなわち、細胞を ESQ PBS で 2 回リンスした後、0.5ml の ESQ Trypsin (LEXICON 社 The Mouse Kit) を加え、37°C で 15~20 分間保温しトリプシン処理を行った後、さらに 0.5ml の ES Cell medium を加え、35~40 回ピペッティングを行い ES 細胞の塊を完全に解離させた。この細胞懸濁液を 15ml 遠心チューブに移し、さらに 1ml の ES Cell Medium でウェルを洗ってチューブに回収した。チューブを 1,000rpm で 7 分間遠心し、培地を取り除き 0.25ml ES Cell Medium に再懸濁し、0.25ml の 2 x Freezing medium を加えた。クライオジェニックバイアルにウェルの中身を移し、-80°C で凍らせ、液体窒素中で保存した。

胚盤胞への注入及び DNA 抽出用の細胞は、ES 細胞の塊を完全に解離させた後、その四分の一を胚盤胞への注入に用い、残りの細胞の三分の一、及び三分の二をそれぞれゼラチンコートした 60mm ディッシュに継代した。前者は細胞がコンフルエントにまで増殖したところでサザンブロット解析用のゲノム DNA を抽出し、後者の細胞はコンフルエントにまで増殖したところで 3 本に分けて凍結した。

〔実施例 3〕 組み換え LKB1 遺伝子を持つ ES 細胞によるキメラマウスの作製
相同組み換えが確認された ES 細胞クローンについて、C57BL/6J 系マウスの胚盤胞を宿主胚としてキメラ胚を作製し、それを偽妊娠マウスの子宮角に移植して産仔を得た。宿主胚の採取は、妊娠 2 日目に、100 μ M EDTA を添加した Whitten's 培地で、卵管と子宮を灌流することによって行った。8 細胞期胚または桑実胚を 24 時間 Whitten's 培地で培養し、得られた胚盤胞を注入に用いた。注入に用いた ES 細胞は、継代してから 2 あるいは 3 日目に TE 処理により分散させ、顕微操作に供するまで 4°C で静置した。

ES 細胞の注入用ピペットとしては、Cook IVF 社製の polar body extrusion pi

pette (内径約 $20\mu\text{m}$) を用いた。胚保定用ピペットとしては、外径 1mm の微小ガラス管 (NARISHIGE) を微小電極作製器 (Sutter 社 P-98/IVF) を用いて細く引き延ばした後、マイクロフォージ (De Fonburun) を用いて外径 $50\sim 100\mu\text{m}$ の部分で切断し、さらに口径を $10\sim 20\mu\text{m}$ に加工したものをを用いた。

注入用ピペットと保定用ピペットは、先端から約 5mm の部分を約 30 度曲げて、マイクロマニピュレーター (LEITZ) に接続した。顕微操作に用いたチャンバーとしては、穴あきスライドガラスにカバーガラスを蜜蝋で接着したものをを用い、その上に約 $20\mu\text{l}$ の 0.3% BSA を加えた Hepes-buffered Whitten's 培地のドロップを 2 個置き、上面を流動パラフィン (ナカライテスク 261-37 SP) で覆った。一方のドロップには、約 100 個の ES 細胞を入れ、他方には拡張胚盤胞を $10\sim 15$ 個入れ、胚 1 個あたり $10\sim 15$ 個の ES 細胞を注入した。

顕微操作はすべて、倒立顕微鏡下で行った。操作胚は、 $1\sim 2$ 時間の培養後、偽妊娠 2 日目の ICR 系受容雌の子宮角に移植した。分娩予定日に至っても産仔を娩出しなかった受容雌については、帝王切開を施し、里親に保育させた。

C57BL/6J 系マウスの胚盤胞 59 個に、クローン 358 ES 細胞を注入した結果、 55 個が生存した (成功率 93%)。この 55 個を偽妊娠 2 日目の ICR 系受容雌の子宮角に移植した結果、 28 匹の産仔が得られた。相同組み換え体に由来する部分の毛色は野生色を呈し、C57BL/6J 系マウスに由来する部分の毛色はブラック色を呈する。得られた 28 匹の産仔のうち、毛色からキメラマウスと判定できたのは 23 匹であり、そのうちの 21 匹が形態的に雄を示していた。これらのキメラマウスにおける毛色から判断した ES 細胞の寄与率は $20\sim 100\%$ の幅であり、寄与率が 60% 未満のものが 2 例、 60% 以上 90% 未満のものが 4 例、 90% 以上のものが 15 例であった。同様に、クローン 236 ES 細胞及びクローン 256 ES 細胞からもキメラマウスが得られた。これらのキメラマウス作出に関する成績を表 1 に示した。

表 1

キメラマウス作出成績表										
ESコロニー	ホスト胚 系統	注入胚 / 操作 数 数	%	移植胚数	着床数	産仔数 (%)	毛色キメラ数		寄与率	
							♂	♀		
236	B6	70 / 74	95%	70	46	24 34%	17	7	12 50%	2
256	B6	57 / 58	98%	57	44	20 39%	11	9	4 18%	0
260	B6	40 / 45	89%	40	13	5 13%	4	1	0 0%	—
358	B6	55 / 59	93%	55	—	28 51%	22	6	23 82%	2
										♂90%以上6匹、90%未満～60%以上2匹、60%未満2匹、♀60%未満2匹 ♂90%以上3匹、80%未満～60%以上1匹、60%未満2匹 ♂90%以上15匹、90%未満～60%以上4匹、60%未満2匹、♀60%未満2匹

【実施例 4】 相同組み換え体の生殖系列への伝達の検定

実施例 3 のキメラマウスを C57BL/6J 系マウスと交配させ、ES 細胞由来の産仔が得られるか否かを検定した。キメラマウスの生殖細胞が ES 細胞に由来していれば、娩出される産仔の毛色は、野性色を呈し、C57BL/6J 系マウスの胚盤胞に由来していればブラック色を呈することとなる。

クローン 358 ES 細胞については、性成熟に達する前に死亡した 5 例を除いた 16 例 (No. 358-1~16) のキメラマウスのうち、6 例 (No. 358-1、2、5、7、8、13) において、ES 細胞の生殖系列への伝達が確認された。野性色を示した産仔数/得られた産仔数は、それぞれ、7/9、2/2、3/14、8/8、5/16、2/11 であった。またクローン 256 ES 細胞についても、4 例 (No. 256-1~4) のキメラマウスのうち 2 例 (No. 256-1、2) において ES 細胞の生殖系列への伝達が確認された。野性色を示した産仔数/得られた産仔数は、それぞれ、2/3 と 1/13 であった。

次に、これらの野性色マウスのうち 27 匹について尾の一部から DNA を抽出し、PCR 及びサザンブロットにより、変異 LKB1 アリルが伝達されているかを調べた。その結果、クローン 358 ES 細胞由来の産仔は 10 例において、そしてクローン 256 ES 細胞由来の産仔では 1 例において変異 LKB1 アリルが伝達されていることが確認された (図 9)。

以上述べた変異アリル伝達の成績を表 2 に示した。

表 2

変異アリル伝達の成績表

キメラマウス No.	ESクローン	産仔数	陽性数		
			毛色	PCR	サザンブロット
358-1	358	9	7	0	-
358-2	358	2	2	2	2
358-3	358	6	0	-	-
358-4	358	3	0	-	-
358-5	358	14	3	0	-
358-6	358	14	0	-	-
358-7	358	8	8	3	3
358-8	358	16	5	5	5
358-9	358	1	0	-	-
358-10	358	8	0	-	-
358-11	358	-	-	-	-
358-12	358	6	-	-	-
358-13	358	11	2	-	-
358-14	358	-	-	-	-
358-15	358	-	-	-	-
358-16	358	-	-	-	-
256-1	256	3	2	1	1
256-2	256	13	1	0	-
256-3	256	7	0	-	-
256-4	256	-	-	-	-
総計		121	30	11	11

[実施例 5] Cre-loxP システムによる LKB1 遺伝子の失活

Cre 遺伝子を一過性に ES 細胞内で発現させることにより、コンベンショナルな遺伝子欠失と、コンディショナルな遺伝子欠失の両タイプの ES 細胞を作製できる (Taniguchi, M et al. Nucleic Acids Research 26:679-680, 1998)。コンディショナルなタイプ (タイプ 2、図 5) の ES 細胞由来の個体は野生型の表現型を示すが、Cre 遺伝子が発現させることにより LKB1 遺伝子を失活させることができる。

また、このシステムを利用することにより、組織特異的、あるいは時期特異的に発現を制御できるプロモーターで Cre の発現を制御したトランスジェニックマウスと交配したり、Cre 遺伝子を発現するように構築したアデノウイルスなどを感染させることにより、Cre 遺伝子が発現している細胞において特異的に loxP 配列に挟まれた LKB1 遺伝子のエクソン 2 から 8 に渡る領域を欠失させ、LKB1 遺伝子の機能を欠損させることができる。このように Cre-loxP システムにおいては、Cre 遺伝子を発現させることにより、ES 細胞、マウス個体、あるいはマウス受精卵において、時期特異的、あるいは組織特異的に loxP 配列によって挟まれた遺伝子を組み換えによって欠失させることが可能である。

【実施例 6】 Cre-loxP システムを利用した LKB1 遺伝子欠損マウスの作製とその表現型

ES 細胞の変異 LKB1 アリルが伝達されていることが確認されたクローン 358 雄マウスの精子と、C57BL/6J マウスの卵子とを体外受精法 (Toyoda Y et al, Jpn. J. Anim. Reprod. 1971; 16: 147-151) で受精させることにより得られた前核期卵 (この時点では図 10 の組み換えアリルと記載された状態に LKB1 構造遺伝子はなっている) の前核に、Cre 遺伝子の発現が MC1 プロモーターによって制御された pCre-pac プラスミド (Taniguchi M et al, Nucleic Acids Res 1998; 26(2): 679-680) を環状な状態で注入した (Araki K et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995; 92: 160-164)。注入は、86 個の受精卵に行い、そのうちの 75 個が注入後も生存していた。その後、受精卵を 24 時間 100 μ M EDTA を添加した Whitten's 培地で培養し、2 細胞期に発生した 61 個を、偽妊娠 0.5 日目の ICR 受容雌の卵管に移植した。12 例の産仔が得られ、全例が離乳まで至った。離乳したマウスの尾の一部から DNA を抽出し、PCR 法により、LKB1 遺伝子の loxP 配列に挟まれたエクソン 2 から 8 に渡る領域が欠損している個体の選別を行った。PCR は以下のごとく行った。

プライマーセット

A セット: MPJ69 プライマー (5' CCTTTGGCTGCTGGGTGACTTCTG 3' : 配列番号: 20)

と MPJ37 プライマー (配列番号: 18)

B セット: MPJ69 プライマー (配列番号: 20) と MPJ56 プライマー (5' ACAGAG

CTCTCCAAGGGAGA 3' : 配列番号: 21)

反応組成液

10 x ExTaq バッファー (TaKaRa) 5 μ l

2.5mM dNTPs 4 μ l

ExTaq (TaKaRa) 0.5 μ l

抗 Taq 抗体 (CLONTECH) 0.5 μ l

20 μ M フォワードプライマー 1 μ l

20 μ M リバースプライマー 1 μ l

サンプル 1 μ l

H₂O 37 μ l

反応条件

94°C、2 分→ (94°C、30 秒→68°C、3 分) x 35 サイクル→72°C、10 分

A セットのプライマーセットで PCR を行ったところ、約 2.1kbp のバンドが一部のマウスに現れた (図 11 A)。このバンドのサイズは loxP 配列に挟まれたエキソン 2 から 8 までの領域が欠失した場合に現れることが予想されるサイズである (図 10)。これらのマウスをヌルアリルを持つ個体であると判断し以下の解析に用いた。ヌルアリルを持つ雄マウス (ヘテロ欠損) の精子と、C57BL/6J 雌マウスの卵子とを体外受精法により受精させ、得られた受精卵を偽妊娠 0.5 日目の ICR の卵管に移植し、産仔 (F1) を得た。F1 マウスの尾から抽出したゲノム DNA をサンプルとし、B セットのプライマーセットによる PCR を行うことにより、ヌルアリルが伝

達されたヘテロ欠損マウスを選択した (図 11 B)。B セットのプライマーを用いた場合、ヌルアリルからは約 1.2kbp のサイズを持つバンドが増幅されることが予想されるため (図 10)、このサイズのバンドが現れたマウスをヌルアリルが伝達された個体であると判断した。一部のサンプルについては、この 1.2kbp のバンドを直接シーケンシングすることにより、これが予想通りに欠失が起きたヌルアリルから由来するバンドであることを確認した。次に、ヌルアリルをホモで持つ F2 マウスを作出するために、F1 ヘテロ欠損マウスの精子と卵子を用いた体外受精を行った。受精卵を偽妊娠雌に移植することにより得られた F2 マウスの遺伝子型をサザンブロット法により解析した。マウスの尾から抽出したゲノム DNA を BamHI で消化後、イントロン 8 の一部に相当するプローブ 7 (図 10)。をプローブとしハイブリダイゼーションを行った。プローブ 7 は相同組み換え用ベクター (LT6) を鋳型とし、LOXP3 S2 プライマー (配列番号 : 17) と MPJ60 プライマー (5' CTC TCCCAAACCCTCTGACT 3' : 配列番号 : 22) を用いた PCR により増幅して得た。ハイブリダイゼーションは、ULTRAhyb™ (Ambion) を用い、メーカー推奨の方法に従って行った。野性型アリルからはイントロン 7 とイントロン 8 に存在する BamHI サイトに挟まれた約 2kbp のバンドが現れることが予想され、ヌルアリルからは、イントロン 7 中の BamHI サイトが存在しないため、イントロン 1 を含む 7kbp 以上のバンドが現れることが予想される (図 10)。サザンブロット法による解析の結果の一部を図 11 C に示す。全てのサンプルに共通して野性型アリル由来のバンドが見られ、一部のサンプルにおいてはヌルアリル由来の大きいバンドが見られる。サザンブロット法による解析の結果、野性型アリルのホモ : ヌルアリルのヘテロ : ヌルアリルのホモマウスの比率はそれぞれ、55 : 90 : 0 であることが判明した。この結果から、LKB1 遺伝子の欠損したマウスは、胎仔期に致死になっていることが示された。すなわち、LKB1 遺伝子は胚発生にとって必須な分子であるものと考えられた。

産業上の利用の可能性

本発明により、LKB1 遺伝子の発現を人為的に抑制しうる、または抑制された哺乳動物が提供された。本発明の哺乳動物においては、Cre-loxP システムを利用することにより、LKB1 遺伝子を時期特異的、組織特異的に破壊することができ、従来大きな問題点となっていた、目的遺伝子の欠失が胎性致死を招きその後の機能解析が不可能である場合においても、それを回避することが可能であると考えられる。本発明の哺乳動物は、ヒト PJS や、その他癌などの LKB1 遺伝子の欠損に基づく疾病の発症機構の解明、及び治療薬、治療法等の開発のためのツールとして非常に有用である。

請求の範囲

1. 内在性 LKB1 遺伝子の発現を人為的に抑制することができる非ヒト哺乳動物。
2. 内在性 LKB1 遺伝子の発現の抑制を、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部を欠損させることにより誘導する、請求項 1 に記載の非ヒト哺乳動物。
3. ゲノム上の LKB1 遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部が、少なくとも 1 組の loxP 配列により挟まれた構造を有する、請求項 1 または 2 に記載の非ヒト哺乳動物。
4. げっ歯類である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物。
5. マウスである、請求項 4 に記載の非ヒト哺乳動物。
6. LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されている非ヒト哺乳動物。
7. LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現が、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部の欠損により抑制されている、請求項 6 に記載の非ヒト哺乳動物。
8. げっ歯類である、請求項 6 または 7 に記載の非ヒト哺乳動物。
9. マウスである、請求項 8 に記載の非ヒト哺乳動物。
10. LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現の抑制を人為的に誘導することができ、かつ、個体へ分化させることが可能な非ヒト哺乳動物細胞。
11. LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現の抑制を、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部を欠損させることにより誘導する、請求項 10 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。
12. ゲノム上の LKB1 遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部が、少なくとも 1 組の loxP 配列により挟まれた構造を有する、請求項 10 または 11 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

13. Cre 遺伝子を発現可能に保持している、請求項 12 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

14. げっ歯類細胞である、請求項 10 から 13 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞。

15. マウス細胞である、請求項 14 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

16. 胚性幹細胞である、請求項 10 から 15 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞。

17. LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されており、かつ、個体へ分化させることが可能な非ヒト哺乳動物細胞。

18. LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現が、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部の欠損により抑制されている、請求項 17 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

19. 請求項 12 に記載の非ヒト哺乳動物細胞において Cre 遺伝子を発現させることによって得られる、請求項 18 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

20. げっ歯類細胞である、請求項 17 から 19 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞。

21. マウス細胞である、請求項 20 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

22. 胚性幹細胞である、請求項 17 から 21 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞。

23. 請求項 1 から 5 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、
(a) 請求項 16 に記載の非ヒト哺乳動物細胞を、妊娠した雌から得た胚に挿入する工程、および

(b) 該胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法。

24. 請求項 6 から 9 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、
(a) 請求項 22 に記載の非ヒト哺乳動物細胞を、妊娠した雌から得た胚に挿入する工程、および

(b) 該胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法。

25. 請求項7に記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

(a) 請求項3に記載の非ヒト哺乳動物の受精卵または胚を提供する工程、

(b) 該受精卵または胚に Cre 遺伝子を導入し、発現させる工程、および

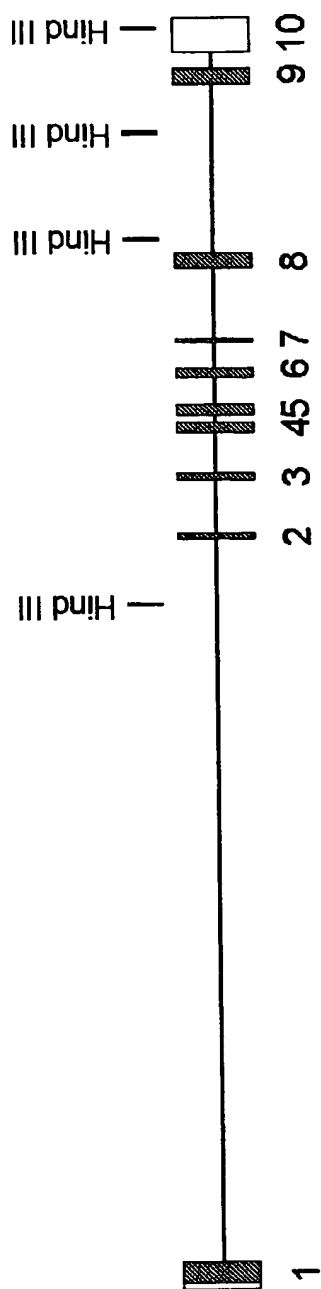
(c) 該受精卵または胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法。

26. 請求項7に記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、請求項3に記載の非ヒト哺乳動物に、Cre 遺伝子を導入し、発現させる工程、を含む方法。

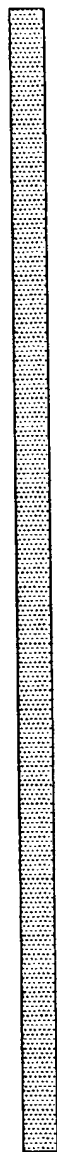
27. 請求項7に記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、請求項3に記載の非ヒト哺乳動物を、Cre 遺伝子をゲノム上に有する非ヒト哺乳動物と交配させ、その後代を得る工程を含む方法。

1 / 11

図 1



クローン072



断片1 断片2 断片3 断片4

クローン243



2 / 1 1

☒ 2

GGAGATCCAGCTGCTGCGGGGCTGCGGCATCGGAATGTGATCCAGCTTGTGGACGTGCTGTACAATGAGGAGAAGCAGA
AGATatatacctgtgggtggagtggtgggtggccctgtgttagggctggaagccttctgcaaggcctctggcagca
atagtgtacatgtcatcctgtggtgcctgtcagctcatcaggcagggagcaaggcatggggcttccacctggtgccag
cctgttctgagcagtgtggctgggactgggcatggcctcacaggacttggggcctatgtacattgacaggccccggct
ggttctagaggtttccatgtgcccccttccagaggtagaggtgcacagcctacgttgcatctgggcagtctgggagc
attctgagaaccagtgccctgcagcccaactcctgttacctatctctccctgtggctagtacaccagctgatttcagt
cctgttgtaattctatgtgactccatgtggtccaagtcactgtggtggtcttgtggaccctgtgagtactgataggagc
gcagaatggcgggagagcagagtgtgtgtgtctgttggccagcggggccctccagaccactgttgctaggagcagggc
tcctgggtctggtgtgtgtcttcccttagcgccctacGTATATGGTGATGGAGTACTGCGTATGTGGCATGCAGGAGATG
CTGGACAGTGTGCGGAGAAGCGCTTCCTGTGTGCCAAGCTCATGGgtgagtgcctgtctgggtgcaggaggagcagcc
attgtcaggaaaccagtggttcttgggccccagtttttaaccagccaatgtgcttagggttacctcttgttaggcc
ctgtggtcccgtgccccgcagagccatagtgggtctgagtcctgttcagtgtctccaggttcagcagaatcacatcccc
tggttagcagagaacaaaggggaaggggaaggaagcaagccagaggggaaacctggctccccctgggcctgggcagcag
tgactgccagttgcctgtgtaatttttagtggccagccttctgactctcaggtctgtttgcctgagccctaaacatctta
tcaccttgiaggccaggtctcatgagtcctccaaacttcataatcagacttatgtaggtaccatggtatgggctgagacac
tgtggggcctgagccagtcaccaccattcagTACTTCGCCAGCTGATTGACGGCCTGGAATACCTACACAGCCAGGGC
ATTGTTACAAAGGACATCAAGCCGGCAACCTGCTACTCACCACCAATGGCACACTCAAGATCTCCGACCTCGGTGTTGC
CGAGgtaggcaccatgtgcaggatcatgggcccgttctcctgagctgccctgactctcactgccctgcagGCCCTGCAC
CCTTTCGCTGTGGATGACACCTGCCGACAAGCCAGGGCTCCCCGGCCTTCCAGCCTCCTGAGATTGCCAATGGACTGGA
CACCTTTTCAGGTTTCAAGGTGGACATCTGGTCAAGTGGGCTCACACTgtaagtgtcttgtgtgtacctgttagcagatg
ggggctgtgggttttccctagtgttcttgggcctttttgccacagtgtgtggctagcaggttgacattccaggtctg
tgggtgtggttccctaccctacccacccactccacagggttttgcctgcacacagatgtaggtgccatgactgcacat
ctaccagtttaacatgtgtctgtctgggagttggggcacctgtcctctggtctccagtggtggcagcactgacactcttt
tcctatgtgaagTTACAACATCACCACGGGCTGTACCCATTTGAGGGGACAATATCTACAAGCTCTTTGAGAACATTG
GGAGAGGAGACTTCACCATCCCTTGTGACTGCGGCCACCACTCTCTGACCTACTCCGAGgtgggcatctctaaatcacc
caaatgttaggacagcaaggacagagccccctggtctggagggttctgacctactgtcaggacagccttgtccgcca
ggatgggaggtttctgagattgcttcccccatctggggccgggtgggtgggtgggtctcagtgctatggggcctagg
aaggccaaggggatggatgtctgttagtggtgctgtagcacaaagcaggcacctgctacactcacttatctcttctgtccta
cagGGATGTTGGAGTATGAGCCGGCCAAGAGGTTCTCCATCCGACAGATTAGGCAGCACAGgtgagcatggccggcctgt
ctcagcctgtctggggtctgagctgagaacatggtctcagagggtcttaggtcatcacaggagtaaggatcagtgctgtgt
gtgtattgatgtctgggaaggctgtgtgtgaacttggggtgtgacaggggtgcccaatgcaggcctccctacctttatca
tttgttcaggagtgaggcgttatgtggcctgagaagctgtagatttcagggcctagaattagagacggatcctcccat
ggtggggaggagagtagatggggaagtgtcactttggatcccagctgttcttggccatctggacatggaaatgtgtc

3 / 1 1

図 3

tagggaggccaacaggaagcgtgaggcatggtgtctttcctcacctgaggctaagagccttctgggtaacagtggagcct
ctgtcctccctttgtttatattaccagctggtcagagcctttgggtccaggttctctgtcctcttctcccttcatgctag
actgagactggctcagctgggtgtccccagtgagggttctagcctatccgtgttcaaggcgggtgggactataggtgc
agggacctgattgccaccctagtccaaggcgtgtggctgtcatcagtggttgggttgggttggccagtgtatgggtgt
taggctacctcaagcctgtagccggagcactaaggcctcgtcttatgtaaggacagccatgggtgtgggctttgggtggta
ttggccagccgtggtcacagtgcctggcacctgatgtctgtgtcgtgcacttggccttcttttagCTGGTTCCGGAAGAAACA
CCCTCTGGCTGAGGCGCTCGTACCTATCCCACCAAGCCCAGACACTAAGGACCGCTGGCGCAGTATGACTGTAGTCCCT
ACCTGGAGGACCTGCATGGCCGTGCGGAGGAGGAGGAGGAAGACTTGTGTTGACATTGAGGACGGCATTATCTACACC
CAGGACTTCACAGTGCCTGtaagctggcttggcgcagctcctactggagctgggtactttgtgactctggggctggct
cccttcccaagtctccagccagctaacaatgagccaccaggactgccaaagccatcctgggtggctgtggcatttcactctg
ggctagatgaagggtccctggctgccttagcaggaggagggaaccctggagggcagtgggtaggggcccctgagacag
ccacctgagggaggggtccagtggccctcggctcctggccatgcctgaccttatatcgcttcttcccagggtgtcaggag
gcggccgaggcagggttagcaggatgcatgcacacatgcatgtggaagagccaggggcaggccttctggagagga
gcccaggagggtttggggctttagttagctcctgtctgtgccccaccatgtcctccataaagctttgtccactg
tgtctgcaggtggatgcttccgcgacttccctcctgtcactacctgacaggctccccaccagggttcagagaacatg
cctgggtccaaggcctgagctaggtcctcagtgccagggtggccaccagccagggtccttggggcctttgttctgtgg
cctgcatgccagtcccacttagctcctggcctttcaaatagctttgggtgggagggtaaggaccttgggtactgtgtctc
ctgtagcaattgagagtictaatagcagtgcccgtgggtgccaggtggaatccacaaggacaggtataacctgatgtc
cagtatgggccttggccacagcccttttaaggtttaaagcatccctatgtgggaatagtgtcttctactctgtcacgtg
gagcccttgtctagactgtccacagggtgggtcctggctgagagctgggttctctgtctggggagaagatgtacttagg
tgtgtgttgcagtagggacccttaaggctgtgtgtttgaagggaaggcaagggtctggggacactggttggccatggag
cccatttgtcaaatgggtagtgttgcacagagtgaagtaccgtgtctgaggatagcctgatccctctgtacttggca
tgagggtcggactctgcagcaacaggacaggggttctactcagtgccctgtgtggaggaggggacagatgctttctca
gagtcacctgacctcaagcctcagtcctatgcagagttagccagagtgggtgtgtctagtgtggccaagttagagggtt
tgggagagaaattctggatccaggagcgtgggcagtggtgtgtgtgtgggttccacagccgcatgccaagcactggac
tgtggagtacatgtagacacigacctctggagcctgggaagcttcaggagaggccatcttttggccactgcgagggca
ggccaacagagcaagctggctgcagccctcagctggatgatctccttcccggtgtctatcgcagctagtagtcccagg
ccgaatgcttcatctccttgtgcctgtactgagggtctagagcctctccttggagagctctgtgagctggtgtgggt
gcccaggcttagacaggcaggtgagcgtgggcatgtgtcaggaggccagggtatagcactgtgaaggcagtgggcctgct
tgcctttggagctactgagggtgggtggcaccagaggcttagagcacctccgaccagcctctgtcacagttggggctggc
tgggcccctggggctttgagctacctgccccttgggtcaagctatgcttgccatcttcccgtagGACAGGTCTTGAAGAG
GAAGTGGGTGAGAATGGACAGAGCCACAGTTTGCCCAAGGCTGTTGTGTGAATGGCACAGAGCCCAGCTCAGCAGCAA
GGTGAAGCCAGAAGGCCGACCTGGCACCGCCAACCTGCGCGCAAGGTGTGCTCCAGCAACAAGATCCGCCGGCTCTCGG
CCTGCAAGCAGCAGTACTGAGGCCTACAGgtgggcatgggcctgggtccagccatccctgggtgttcacagtgggtgtct
gctgggtccttagctccttcccgtagggcagtgctgcaagggggaaggtctgggtggttaggtggtactaagtaccacc
cattctaccaacagTGTGTATCAGGATCTCTGGGCAGGTGTCCTGCAAGGCTGGGTTTCCAGGCCTGCCTGTCCACT

4 / 1 1

☒ 4

CACTTCGGGACGTTGGAGCCGAGGGCGGACCTGCTGCCCCAGAAGCACTTTATGTCGAGACCACTGGCCGGCCTTGCCTG
CATGCCGCCCTGCCAGCCTCGCTGCTTTGGGTTGGTTCTTTTTTTTAATAAAACAGGTGGATTTGAGCTATGGCTAT
GAGGGTGTTTGAAATATGGAGCAGGCGGGGCACAGGGTGGCCTGCAGAGAAAACCCAGAGCAAACAAATATGCAGAGAC
ATTTATGATTAACCAGACAACACGACCAACCACAGAGGGCGCAGGCAGGGAGTGGGCAGGCACTCACAGCGAGTCTGCC
CTATCTTTTGGCAATAAATAAAGCTTGGGAAACTTG

5 / 11

図 5

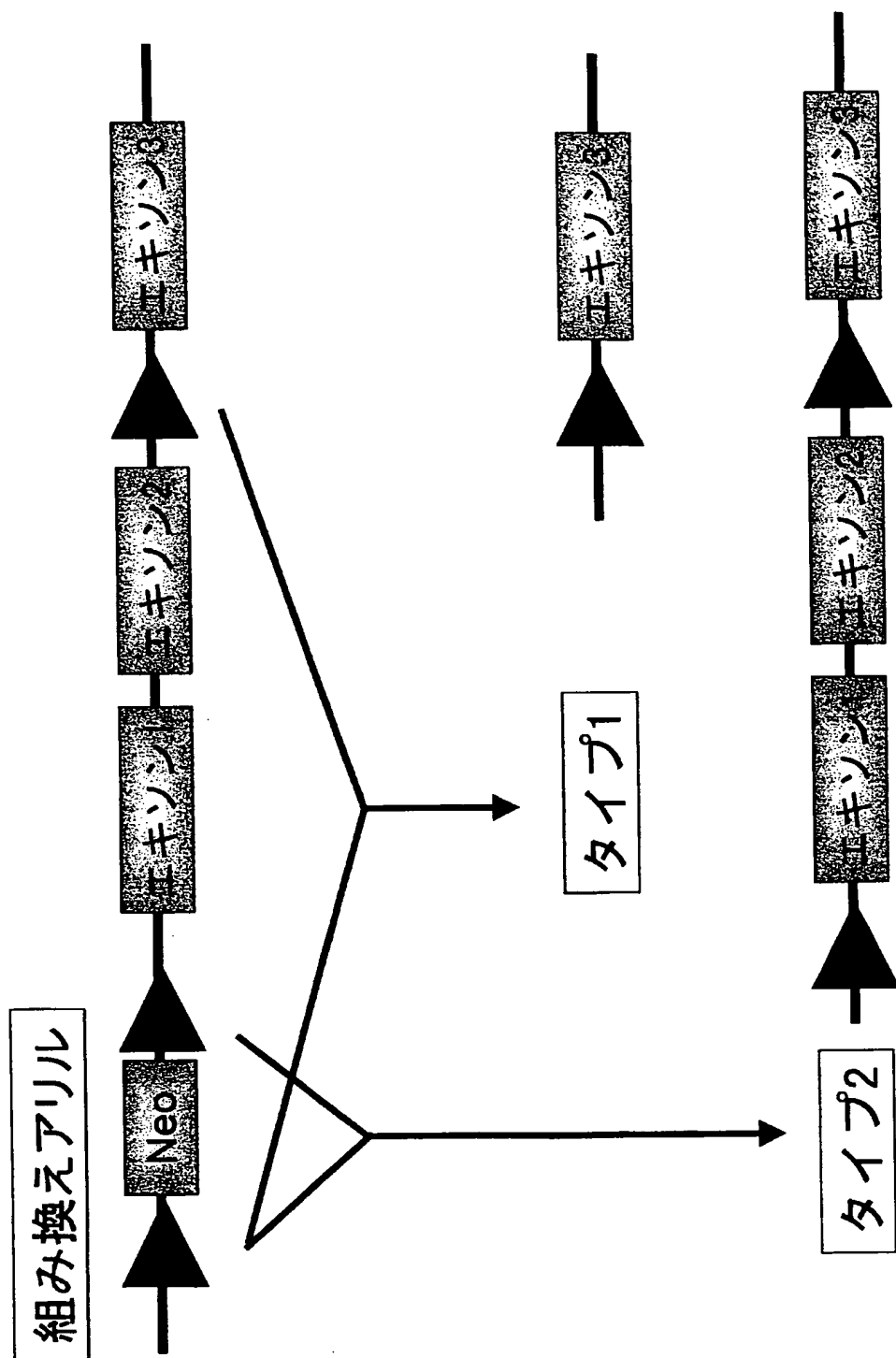


图 6

F23 合成リンカー

5' tgcgacacatcgataccgctcgagatcg 3'

3' acgtacgctgttagctatgctgagctcagcttaa 5'

AvaIII ClaI XhoI EcoRI

loxP2 合成リンカー

SpeI	HindIII	loxP ->	EcoRI	BamHI	loxP ->	HindIII	XhoI
5'	ctaggcaagctcaaacctcgatagcatatattacgaagattacgacttcgacccatatacttcgtatagcatatatacgaagttatcagcttc						3'
3'	agttcgaagtattgaagcatatcgtgatgtantatggttcattcgaatctgattgaagcatatcgtatgtaataatgttcattcgaagcagag						5'

7 / 11

図 7

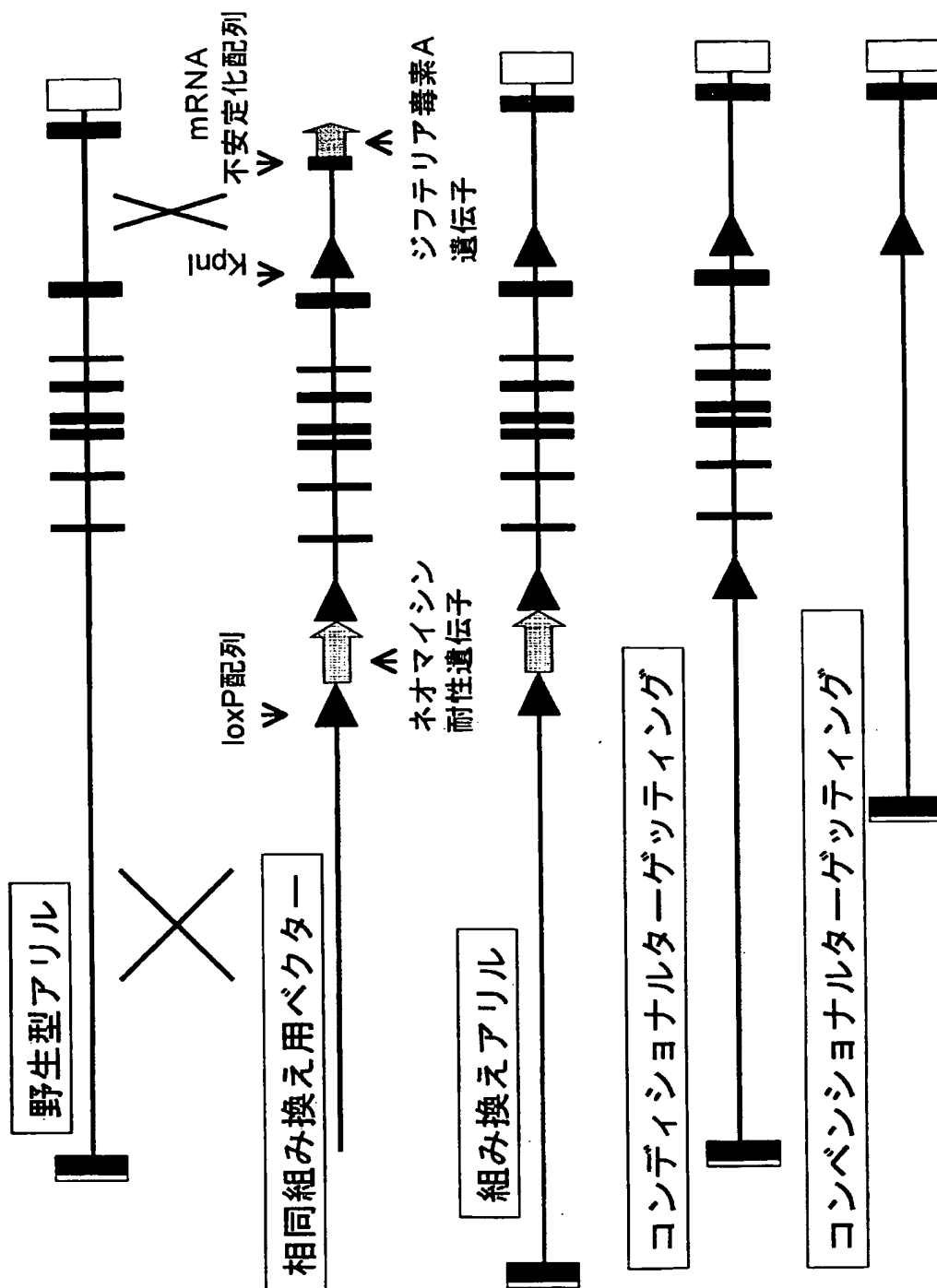


図 8

サザンブロット解析

PCR解析

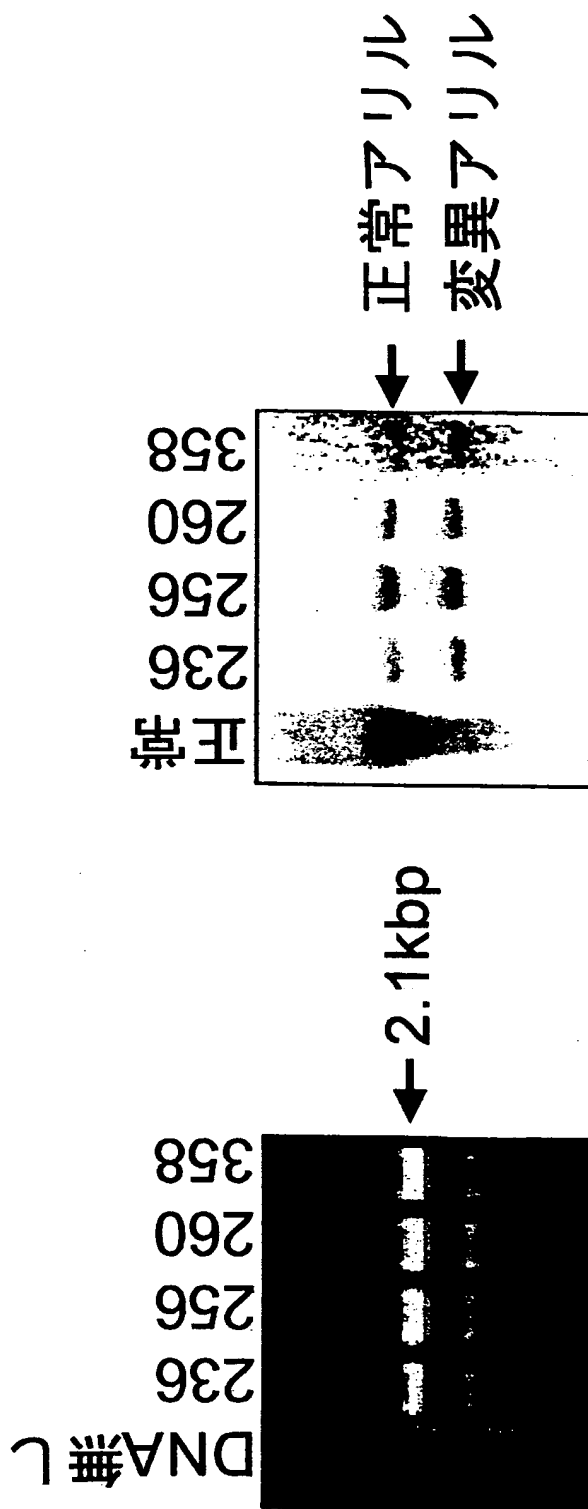
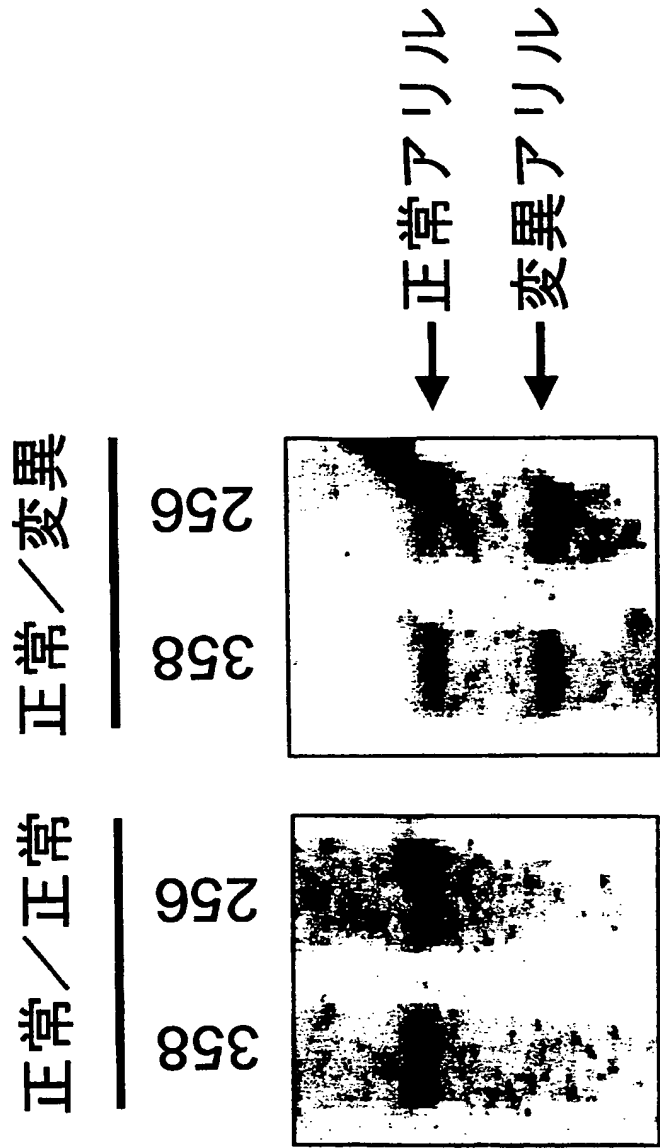
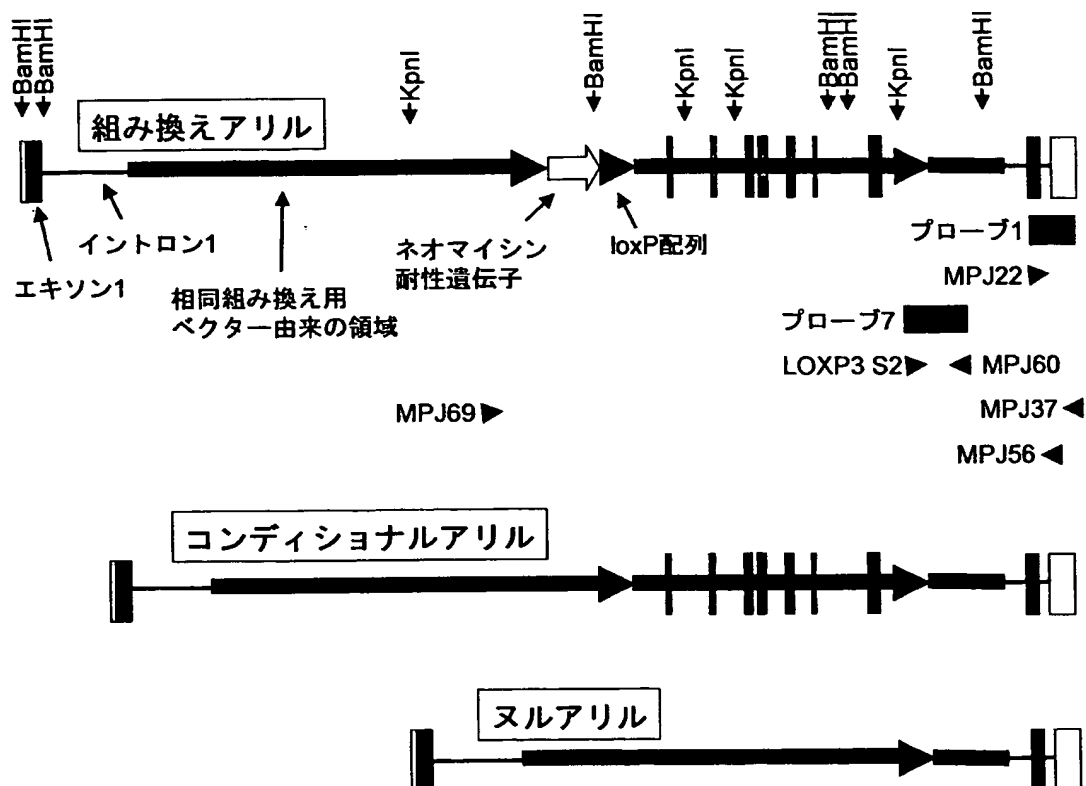


図 9



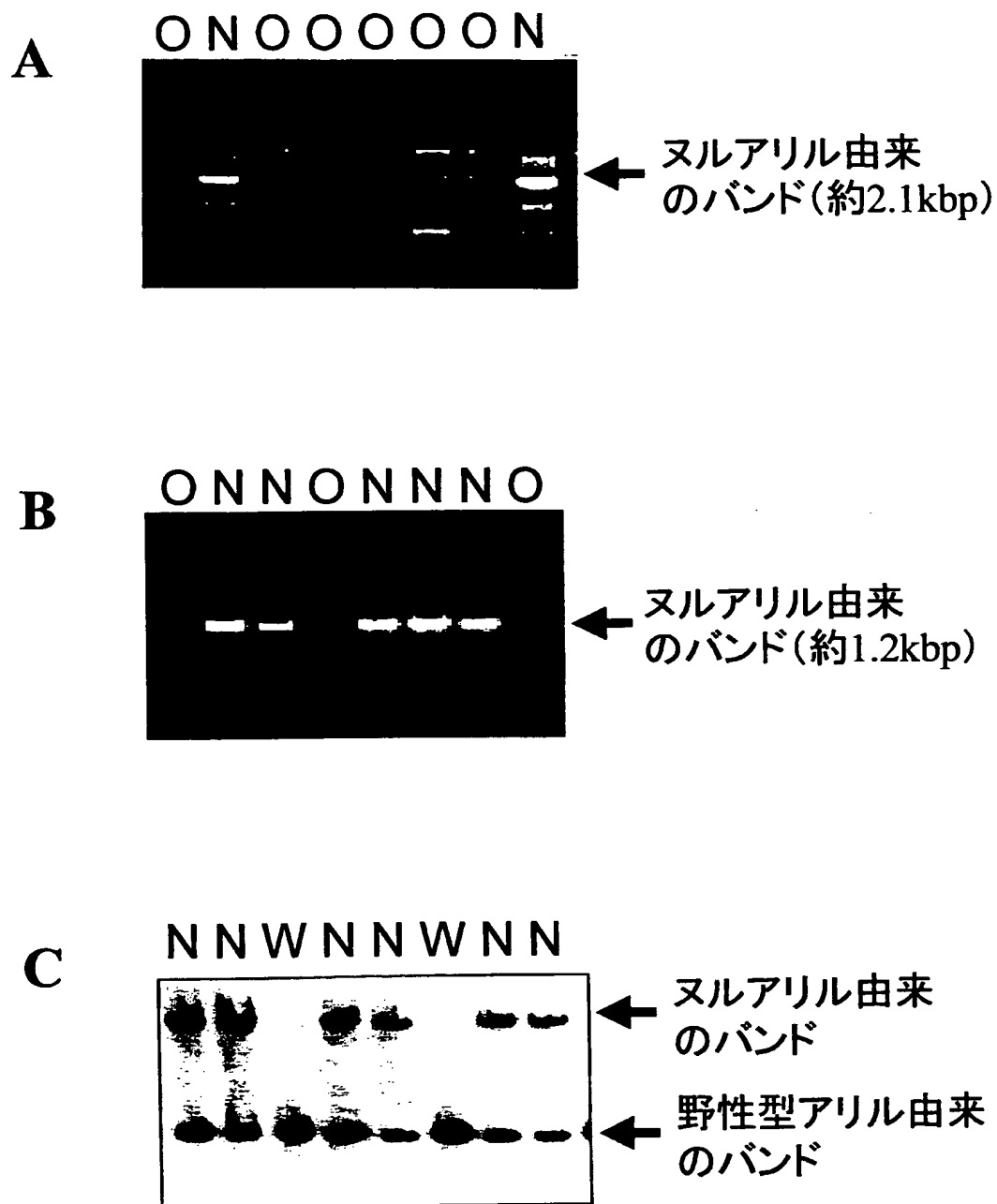
10/11

図10



11/11

図 11



SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.
CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> LKB1 gene knock out animal

<130> C2-103PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-153030

<151> 1999-05-31

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1795

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

2/30

<222> (51).. (1358)

<400> 1

aattcggatc caaggcggcc cgaaggacag aggacaaaga gtgggccagg atg gac 56

Met Asp

1

gtg gcg gac ccc gag ccg ttg ggc ctt ttc tcc gag ggc gag ctg atg 104

Val Ala Asp Pro Glu Pro Leu Gly Leu Phe Ser Glu Gly Glu Leu Met

5

10

15

tcg gtg ggc atg gac acc ttc atc cac cgc atc gac tcc acc gag gta 152

Ser Val Gly Met Asp Thr Phe Ile His Arg Ile Asp Ser Thr Glu Val

20

25

30

atc tac cag ccg cgc cgc aaa cgc gcc aag ctc atc ggc aag tac ctg 200

Ile Tyr Gln Pro Arg Arg Lys Arg Ala Lys Leu Ile Gly Lys Tyr Leu

35

40

45

50

atg ggg gac ctg ctc ggg gag ggc tcg tac ggc aag gtg aag gag gtg 248

Met Gly Asp Leu Leu Gly Glu Gly Ser Tyr Gly Lys Val Lys Glu Val

55

60

65

ctg gac tcc gag acc tta tgc cgc agg gcg gtc aag atc ctc aag aag 296

Leu Asp Ser Glu Thr Leu Cys Arg Arg Ala Val Lys Ile Leu Lys Lys

70

75

80

3/30

aaa aag ctg cgc agg atc ccc aat gga gag gcc aac gtc aag aag gag 344

Lys Lys Leu Arg Arg Ile Pro Asn Gly Glu Ala Asn Val Lys Lys Glu

85

90

95

atc cag ctg ctg cgg cgg ctg cgg cat cgg aat gtg atc cag ctt gtg 392

Ile Gln Leu Leu Arg Arg Leu Arg His Arg Asn Val Ile Gln Leu Val

100

105

110

gac gtg ctg tac aat gag gag aag cag aag atg tat atg gtg atg gag 440

Asp Val Leu Tyr Asn Glu Glu Lys Gln Lys Met Tyr Met Val Met Glu

115

120

125

130

tac tgc gta tgt ggc atg cag gag atg ctg gac agt gtg ccg gag aag 488

Tyr Cys Val Cys Gly Met Gln Glu Met Leu Asp Ser Val Pro Glu Lys

135

140

145

cgc ttc cct gtg tgc caa gct cat ggg tac ttc cgc cag ctg att gac 536

Arg Phe Pro Val Cys Gln Ala His Gly Tyr Phe Arg Gln Leu Ile Asp

150

155

160

ggc ctg gaa tac cta cac agc cag ggc att gtt cac aag gac atc aag 584

Gly Leu Glu Tyr Leu His Ser Gln Gly Ile Val His Lys Asp Ile Lys

165

170

175

ccg ggc aac ctg cta ctc acc acc aat ggc aca ctc aag atc tcc gac 632

4/30

Pro Gly Asn Leu Leu Leu Thr Thr Asn Gly Thr Leu Lys Ile Ser Asp

180

185

190

ctc ggt gtt gcc gag gcc ctg cac cct ttc gct gtg gat gac acc tgc 680

Leu Gly Val Ala Glu Ala Leu His Pro Phe Ala Val Asp Asp Thr Cys

195

200

205

210

cgg aca agc cag ggc tcc ccg gcc ttc cag cct cct gag att gcc aat 728

Arg Thr Ser Gln Gly Ser Pro Ala Phe Gln Pro Pro Glu Ile Ala Asn

215

220

225

gga ctg gac acc ttt tca ggt ttc aag gtg gac atc tgg tca gct ggg 776

Gly Leu Asp Thr Phe Ser Gly Phe Lys Val Asp Ile Trp Ser Ala Gly

230

235

240

gtc aca ctt tac aac atc acc acg ggc ctg tac cca ttt gag ggg gac 824

Val Thr Leu Tyr Asn Ile Thr Thr Gly Leu Tyr Pro Phe Glu Gly Asp

245

250

255

aat atc tac aag ctc ttt gag aac att ggg aga gga gac ttc acc atc 872

Asn Ile Tyr Lys Leu Phe Glu Asn Ile Gly Arg Gly Asp Phe Thr Ile

260

265

270

cct tgt gac tgc ggc cca cca ctc tct gac cta ctc cga ggg atg ttg 920

Pro Cys Asp Cys Gly Pro Pro Leu Ser Asp Leu Leu Arg Gly Met Leu

275

280

285

290

5/30

gag tat gag ccg gcc aag agg ttc tcc atc cga cag att agg cag cac 968
Glu Tyr Glu Pro Ala Lys Arg Phe Ser Ile Arg Gln Ile Arg Gln His
295 300 305

agc tgg ttc cgg aag aaa cac cct ctg gct gag gcg ctc gta cct atc 1016
Ser Trp Phe Arg Lys Lys His Pro Leu Ala Glu Ala Leu Val Pro Ile
310 315 320

cca cca agc cca gac act aag gac cgc tgg cgc agt atg act gta gtg 1064
Pro Pro Ser Pro Asp Thr Lys Asp Arg Trp Arg Ser Met Thr Val Val
325 330 335

ccc tac ctg gag gac ctg cat ggc cgt gcg gag gag gag gag gag gaa 1112
Pro Tyr Leu Glu Asp Leu His Gly Arg Ala Glu Glu Glu Glu Glu Glu
340 345 350

gac ttg ttt gac att gag gac ggc att atc tac acc cag gac ttc aca 1160
Asp Leu Phe Asp Ile Glu Asp Gly Ile Ile Tyr Thr Gln Asp Phe Thr
355 360 365 370

gtg cct gga cag gtc ctg gaa gag gaa gtg ggt cag aat gga cag agc 1208
Val Pro Gly Gln Val Leu Glu Glu Glu Val Gly Gln Asn Gly Gln Ser
375 380 385

cac agt ttg ccc aag gct gtt tgt gtg aat ggc aca gag ccc cag ctc 1256

6/30

His Ser Leu Pro Lys Ala Val Cys Val Asn Gly Thr Glu Pro Gln Leu

390

395

400

agc agc aag gtg aag cca gaa ggc cga cct ggc acc gcc aac cct gcg 1304

Ser Ser Lys Val Lys Pro Glu Gly Arg Pro Gly Thr Ala Asn Pro Ala

405

410

415

cgc aag gtg tgc tcc agc aac aag atc cgc cgg ctc tcg gcc tgc aag 1352

Arg Lys Val Cys Ser Ser Asn Lys Ile Arg Arg Leu Ser Ala Cys Lys

420

425

430

cag cag tgactgaggc ctacagtgtg tcatcaggat ctctgggcag gtgtccctgc 1408

Gln Gln

435

aaggctgggt tttccaggcc tgcctgtcca ctcaattcgg gacgttggag ccgagggcgg 1468

acctgtgcc ccagaagcac tttatgtcga gaccactggc cggccttgcc tgcattgccg 1528

cctgcgagcc tcgtgtctt tgggttggtt tcttttttt taataaaaca ggtggatttg 1588

agctatggct atgaggggtg ttggaaatat ggagcaggcg gggcacaggg tggcctgcag 1648

agaaaaccag agcaaacaaa tatgcagaga catttatgat taaccagaca acacgaccaa 1708

ccacagaggg cgaggggcag ggagtgggca ggcactcaca gcgagtcctgc cctatctttt 1768

7/30

ggcaataaat aaagcttggg aaacttg

1795

<210> 2

<211> 436

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Asp Val Ala Asp Pro Glu Pro Leu Gly Leu Phe Ser Glu Gly Glu

1

5

10

15

Leu Met Ser Val Gly Met Asp Thr Phe Ile His Arg Ile Asp Ser Thr

20

25

30

Glu Val Ile Tyr Gln Pro Arg Arg Lys Arg Ala Lys Leu Ile Gly Lys

35

40

45

Tyr Leu Met Gly Asp Leu Leu Gly Glu Gly Ser Tyr Gly Lys Val Lys

50

55

60

Glu Val Leu Asp Ser Glu Thr Leu Cys Arg Arg Ala Val Lys Ile Leu

65

70

75

80

Lys Lys Lys Lys Leu Arg Arg Ile Pro Asn Gly Glu Ala Asn Val Lys

8/30

85	90	95	
Lys Glu Ile Gln Leu Leu Arg Arg Leu Arg His Arg Asn Val Ile Gln			
100	105	110	
Leu Val Asp Val Leu Tyr Asn Glu Glu Lys Gln Lys Met Tyr Met Val			
115	120	125	
Met Glu Tyr Cys Val Cys Gly Met Gln Glu Met Leu Asp Ser Val Pro			
130	135	140	
Glu Lys Arg Phe Pro Val Cys Gln Ala His Gly Tyr Phe Arg Gln Leu			
145	150	155	160
Ile Asp Gly Leu Glu Tyr Leu His Ser Gln Gly Ile Val His Lys Asp			
165	170	175	
Ile Lys Pro Gly Asn Leu Leu Leu Thr Thr Asn Gly Thr Leu Lys Ile			
180	185	190	
Ser Asp Leu Gly Val Ala Glu Ala Leu His Pro Phe Ala Val Asp Asp			
195	200	205	
Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ser Pro Ala Phe Gln Pro Pro Glu Ile			
210	215	220	

9/30

Ala Asn Gly Leu Asp Thr Phe Ser Gly Phe Lys Val Asp Ile Trp Ser

225

230

235

240

Ala Gly Val Thr Leu Tyr Asn Ile Thr Thr Gly Leu Tyr Pro Phe Glu

245

250

255

Gly Asp Asn Ile Tyr Lys Leu Phe Glu Asn Ile Gly Arg Gly Asp Phe

260

265

270

Thr Ile Pro Cys Asp Cys Gly Pro Pro Leu Ser Asp Leu Leu Arg Gly

275

280

285

Met Leu Glu Tyr Glu Pro Ala Lys Arg Phe Ser Ile Arg Gln Ile Arg

290

295

300

Gln His Ser Trp Phe Arg Lys Lys His Pro Leu Ala Glu Ala Leu Val

305

310

315

320

Pro Ile Pro Pro Ser Pro Asp Thr Lys Asp Arg Trp Arg Ser Met Thr

325

330

335

Val Val Pro Tyr Leu Glu Asp Leu His Gly Arg Ala Glu Glu Glu Glu

340

345

350

Glu Glu Asp Leu Phe Asp Ile Glu Asp Gly Ile Ile Tyr Thr Gln Asp

355

360

365

10/30

Phe Thr Val Pro Gly Gln Val Leu Glu Glu Glu Val Gly Gln Asn Gly

370

375

380

Gln Ser His Ser Leu Pro Lys Ala Val Cys Val Asn Gly Thr Glu Pro

385

390

395

400

Gln Leu Ser Ser Lys Val Lys Pro Glu Gly Arg Pro Gly Thr Ala Asn

405

410

415

Pro Ala Arg Lys Val Cys Ser Ser Asn Lys Ile Arg Arg Leu Ser Ala

420

425

430

Cys Lys Gln Gln

435

<210> 3

<211> 5876

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> exon

<222> (1).. (84)

<220>

<221> intron

<222> (85).. (677)

<220>

<221> exon

<222> (678).. (767)

<220>

<221> intron

<222> (768).. (1231)

<220>

<221> exon

<222> (1232).. (1364)

<220>

<221> intron

<222> (1365).. (1431)

<220>

<221> exon

<222> (1432).. (1568)

<220>

<221> intron

12/30

<222> (1569).. (1852)

<220>

<221> exon

<222> (1853).. (1980)

<220>

<221> intron

<222> (1981).. (2243)

<220>

<221> exon

<222> (2244).. (2301)

<220>

<221> intron

<222> (2302).. (3102)

<220>

<221> exon

<222> (3103).. (3299)

<220>

<221> intron

<222> (3300).. (5103)

13/30

<220>

<221> exon

<222> (5104).. (5310)

<220>

<221> intron

<222> (5311).. (5454)

<220>

<221> exon

<222> (5455).. (5876)

<400> 3

ggagatccag ctgctgcggc ggctgcggca tcggaatgtg atccagcttg tggacgtgct 60

gtacaatgag gagaagcaga agatatatcc tgtgggtgga gtgggctggg gtggcccctg 120

tgtaggggc tggaagcctt ctgcaaggcc tctggcagca atagtgtac atgtcatcct 180

gtggtgcctg tcagctcatc aggcagggga gcaaggcatg gggcttcac ctggtgccag 240

cctgttctga gcagtgtggc tgggactggg catggcctca cagggacttg ggcctatgt 300

acattgacag ggccccggct ggttctagag gttccatgc tgccccttc cagaggtaga 360

ggttgacag cctacgttgc atctgggcag tcctgggagc attctgagaa cccagtgcc 420

tgcagcccca actcctggta cccatctctc cctgtggcta gtacaccage tgatttcagt 480

cctgttgtaa tctatgctga ctccatgtgg tccaagtcac tgtggtggtc ttgtggaccc 540

tgtgagtact gatagggagc gcagaatggc gggagagcag agtggtggtg gtctgttggc 600

ccagcggggc cctccagacc actgttgcta ggagcagggc tcctgggctt ggtgtgctgc 660

tttccttagc gccctacgta tatggtgatg gagtactgcg tatgtggcat gcaggagatg 720

ctggacagtg tgccggagaa gcgttcctt gtgtgccaag ctcatgggtg agtgcctgc 780

tgggtgcagg aggagcagcc attgtcagga aaccaggtg ttcttgggcc cccagttttt 840

aaccagcca atgtgcttag ggttacctc ttgttaggcc ctgtggtccc gctgccctgc 900

agagccatag tgggtctgag tcctgttcag tgctcccagg ttcagcagaa tcacatcccc 960

tggttagcag agaacaaagg gaagggaagg gaaggaagca agccagaggg gaaacctggc 1020

tccttgggcc tgggcagcag tgactgccag ttgccctgtg taattttagt ggcccagcct 1080

tctgactctc aggtctgttt gcctgagccc taaacatcta tcaccttgta ggccaggtct 1140

catgagtctc ccaaacttca tatcagactt atgtaggtac catggtatgg gctgagacac 1200

tgtggggcct gagccagtc caccattca ggtacttcg ccagctgatt gacggcctgg 1260

aatacctaca cagccagggc attgttcaca aggacatcaa gccgggcaac ctgctactca 1320

ccaccaatgg cacactcaag atctccgacc tcggtgttgc cgaggtaggc accatgtgca 1380

gggatcatgg gccgcttctc ctgagctgcc ctgactctca ctgccctgca ggccctgcac 1440

cctttcgctg tggatgacac ctgccggaca agccagggt ccccgccctt ccagcctcct 1500

gagattgcca atggactgga caccttttca ggtttcaagg tggacatctg gtcagctggg 1560

gtcacactgt aagtgtcttg tgtgtaccct gtagcagatg gggggctgtg ggttttcct 1620

agtgttcttg gccctttttg cccacagtgt gtggctagca ggttgacat tccaggtctg 1680

tgggtgtggt tcctcacctt acccaccctt actccacagg gttttgcttg cacacagatg 1740

taggtgccat gactgcacat ctaccagtta acatgtgtcc tgtctgggag ttggggcacc 1800

tgtcctctgg tctccagtgt ggccagcact gacactcttt tctatgtga agttacaaca 1860

tcaccacggg cctgtacca tttgaggggg acaatatcta caagctcttt gagaacattg 1920

ggagaggaga cttcaccatc ccttgtgact gcggcccacc actctctgac ctactccgag 1980

gtgggcatct ctaaaccacc caaatgttag gacagcaagg gacagagccc ctggtctgga 2040

ggggttctga cttactgtc aggacagcct ttgtcccca ggatgggagg tttctgagat 2100

tgcttcccc catctggggc cggggtgggt ggggtggggtc tcagtgtat ggggcctagg 2160

aaggccaagg ggatggatgc ttagtggtg cttagcaca aagcaggcac ctgtacact 2220

cattatctc ttctgtcta cagggatgtt ggagtatgag ccggccaaga ggttctccat 2280

ccgacagatt aggcagcaca ggtgagcatg gccggcctgt ctcagcctgc tgggggtctg 2340

agctgagaac atggtctcag aggtgctagg tcacacagg agtaaggatc agtgtgtgt 2400

gtgtattgat gtctgggaag gctgtgtgtg aacttggggt gtgacagggg tgcccaatgc 2460

aggcctccct acctttatca tttgttcag gtagtcaggc gttatgtggc ctgagaagct 2520

gtagatttca gggcctagaa ttagagacgg atcctcccat ggtggggagg gaggagtaga 2580

tggggaagtg tcactttgga tccagctgt tccttgcca tctggacatg gaaatgtgtc 2640

tagggaggcc aacaggaagc gtgaggcatg gtgtctttcc tcacctgagg ctaagagcct 2700

tctgggtaac agtggagcct ctgtcctccc tttgtttatt taccagctgg tcagagcctt 2760

tgggtccagg cttctctgtc ctcttctccc ttcatgctag actgagactg gctcagctgg 2820

gtgtcccca gtgagggtt ctagcctatc cgtgttcaag gcgggtggga ctataggtgc 2880

agggacctga ttgccacccc tagtccaagg cgctgtggct gtcacagtg ggtggtggtt 2940

tgtgccagtg ctatgggtgt taggctacct caagcctgta gccggagcac taaggcctcg 3000

tcttatgtaa ggacagccat ggtgtgggtt ttggtgggta ttggccagcc gtggtcacag 3060

tgccctggcac ctgatgtctg tgctgcactt ggccttcttt agctggttcc ggaagaaaca 3120

ccctctggct gaggcgctcg tacctatccc accaagccca gacactaagg accgctggcg 3180

cagtatgact gtagtgccct acctggagga cctgcatggc cgtgcggagg aggaggagga 3240

ggaagacttg ttgacattg aggacggcat tatctacacc caggacttca cagtgcctgg 3300

taagctggct tggcgcagct cctactggag ctggtgactt tgtgcactct ggggctggtc 3360

cccttcccaa gtctccagcc agctaacatg agccaccagg actgccaaag ccatcctggt 3420

ggctgtggca tticactctg ggctagatga agggctccct ggctgcatct agcaggagga 3480

ggggaaccct ggagggcagt gggtaggggc cctgagacag ccacctgagg gaggtccag 3540

tggccctcgg tectggccat gcctgacctt atatgcctt cttccccagg tgtcgaggag 3600

gcggccgagg cagggcttag cgaggatgca tgcgacacat gcatgtggaa gagccagggc 3660

gcaggccttc ctggagagga gcccgaggag gggtttgggg ctttagtgta gctccctgtc 3720

tgctgcccc a ccatgtcct ccataaagct ttgtccactg tgtctgcagg tggatgcttg 3780

ccgcgacttc cctcctgtca ctaccctgac aggtcccca ccagggtttc agagaacatg 3840

cctgggtcca aggcctgagc taggtcctca gtgccagggt ggccaccagc caggggctct 3900

tggggccttt gttcctgtgg cctgcatgcc agtccactt agtccttggc ctttcaaata 3960

gctttggtgg gagggtaagg accttgggct actgtgtctc ctgtagcaat tgagagtctt 4020

aatagcagtg cccgctgggt gccaggtgga atccacaagg acaggtatac acctgatgtc 4080

cagtatgggc cttggccaca gccctttcta aggtttaaag catccctatg tgggaatagt 4140

gtcttctact ctgtcacgtg gagcccttgt ctagactgtc ccacaggtg ggctcctggc 4200

tgagagctgg tttctctgct ggggagaaga tgtacttagg tgctggttgc atgagggacc 4260

cttaaggctg ctgtggtttg aaggaaggca agggctctggg gacactggtt ggccatggag 4320

cccatttgtc aaatggggta gtgttgacaca gagtgaagt accgtgctct gaggatagcc 4380

tgatccctct gtacttggca tgagggtcgg actctgcagc aacaggacag gggctttcta 4440

ctcagtgcct tgtgtggagg aggggacaga tgcttttcta gagtccacct gacctcaagc 4500

ctcagtccca tgcagagtga gccagagtgg gtgctgctag tgtggccaag tcagagggtt 4560

tgggagagaa attctggatc caggagcgtg ggcagtgggc tgtgtgctgg gttccacagc 4620

cgcattgcca agcactggac tgtggagtta catgtagaca ctgacctctg gagcctggga 4680

agcttcagga gaggccatct tttgtccac tgcgaggga ggccaacaga gcaagctggt 4740

ctgcagccct cagctggatg atctccttc cggtgctcat cgcagctagt agctcccagg 4800

ccgaatgctt catctccttg tgcctgtact gagggtctag agcctctccc ttggagagct 4860

ctgtgagctg gtgctgggct gcccaggcta gacaggcagg tgagcgtggg catgctgcag 4920

gagggccagg gcatagcact gtgaaggcag tgggcctgct tgcctttgga gctactgagg 4980

ggtgggtggc accagaggct agagcacctc cgaccagcct ctgtcacagt tggggctggc 5040

tgggccctgg ggctttgagc tacctgcccc ttggctcaag ctatgcttgc catcttcccg 5100

taggacaggt cctggaagag gaagtgggtc agaatggaca gagccacagt ttgccaagg 5160

ctgttttgtt gaatggcaca gagccccagc tcagcagcaa ggtgaagcca gaaggccgac 5220

ctggcaccgc caaccctgcg cgcaaggtgt gctccagcaa caagatccgc cggtctcgcg 5280

cctgcaagca gcagtgactg aggcctacag gtgggcatgg gccctgggtcc agccatccct 5340

ggtgttcaca gtgggtgtct gctgggctcc tagctccttc ccgtagggca gtgctgcaag 5400

ggggaaggtc tgggtggtga ggtggtacta agtgaccacc cattctacca acagtgtgtc 5460

atcaggatct ctgggcaggt gtccctgcaa ggctgggttt tccaggcctg cctgtccact 5520

cacttcggga cgttggagcc gagggcggac ctgctgcccc agaagcactt tatgtcgaga 5580

ccactggccg gccttgccctg catgccgccc tgcgagcctc gctgtctttg ggttggtttc 5640

ttttttttta ataaaacagg tggatttgag ctatggctat gaggggtgttt ggaaatatgg 5700

agcaggcggg gcacaggggtg gcctgcagag aaaaccaga gcaaacaat atgcagagac 5760

atttatgatt aaccagacaa cacgaccaac cacagagggc gcagggcagg gagtgggcag 5820

gcactcacag cgagtctgcc ctatcttttg gcaataaata aagcttggga aacttg 5876

21/30

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

gatgaattcc gaaggacaga ggacaaagag tgg

33

<210> 5

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

gatgaattct tagaggtctt cttctgagat gagcttctgc tcctgctgct tgcaggccga 60

22/30

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

tgcgagcgtt tttcttcttg agga

24

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

ggatgatggag tactgcgtgt g

21

23/30

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

ggtgaagtct cctctcccaa tggt

24

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

actgcagctg acccaagcca ggat

24

24/30

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

cgaaggacag aggacaaaga gtgg

24

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Linker Sequence

<400> 11

tgcgacacat cgataccgct cgagtcg

27

25/30

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Linker Sequence

<400> 12

aattcgactc gagcggatc gatgtgtcgc atgca

35

<210> 13

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Linker Sequence

<400> 13

ctagtcaagc ttcataactt cgtatagcat acattatacg aagttatcga attcgacctg 60

26/30

gatcccataa cttcgtatag catacattat acgaagttat caagcttcc 109

<210> 14

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Linker Sequence

<400> 14

tcgaggaagc ttgataactt cgtataatgt atgtatagc aagttatggg atccaggtcg 60

aattcgataa cttcgtataa tgtatgctat acgaagttat gaagcttga 109

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

27/30

Synthesized Linker Sequence

<400> 15

gatgttcac ctcgagccca ggctccagag gtcagt

36

<210> 16

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 16

gatctcgaga tcgatggtac cgggtgtcca cataacttcg tatagcatatc attatacgaa 60

gttatctgtc cactgtgtct gcaggt

86

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

28/30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 17

ccggtgttcc acataacttc

20

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 18

gtttccaag ctttatttat tgcc

24

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

29/30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 19

cagcagcaag gtgaagccag aagg

24

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 20

ccttttgctg ctgggtgact tctg

24

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30/30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 21

acagagctct ccaagggaga

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 22

ctctcccaaa ccctctgact

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03504

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A01K 67/027, Int.Cl ⁷ C12N 15/63, C12N 5/10 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01K 67/027, Int.Cl ⁷ C12N 15/63, C12N 5/10 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DIALOG (BIOSIS) JOIS (JICST FILE)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y3	Byoutai Seiri, Vol.14, No.12, 961-966, (1995)	1-27
A	Biochemical and Biophysical Research Communication, Vol.261, No.3, 750-755 (1999)	1-27
A	Human Molecular Genetics, Vol.8, No.8, 1479-1485 (1999)	1-27
Y1	Nature, Vol.391, 184-187 (1998)	1-27
Y1	Nature Genetics, Vol.18, 38-43 (1998)	1-27
Y2	Nature, Vol.336, 348-352 (1988)	1-27
Y3	Idenshi Igaku, Vol.2, No.4, 612-617 (1998)	1-27
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 29 August, 2000 (29.08.00)		Date of mailing of the international search report 12 September, 2000 (12.09.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/03504

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷	A01K 67/027, C12N 15/63, C12N 5/10	
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷	A01K 67/027, C12N 15/63, C12N 5/10	
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
日本国実用新案公報	1922-1996年	
日本国公開実用新案公報	1971-2000年	
日本国登録実用新案公報	1994-2000年	
日本国実用新案登録公報	1996-2000年	
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
DIALOG (BIOSIS) JOIS (JICSTファイル)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y 3	病態生理, Vol. 14, No. 12, 961-966, (1995)	1-27
A	Biochemical and Biophysical Research Communication, Vol. 261, No. 3, 750-755, (1999)	1-27
A	Human Molecular Genetics, Vol. 8, No. 8, 1479-1485, (1999)	1-27
Y 1	Nature, Vol. 391, 184-187, (1998)	1-27
Y 1	Nature Genetics, Vol. 18, 38-43, (1998)	1-27
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリ 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
29.08.00	12.09.00	
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	2B 2914
日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	坂田 誠 印	
	電話番号 03-3581-1101	内線 3236

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)